

SINGULÄRER N^+ /SI-AUSTAUSCH IM MOLEKÜLGERÜST ALLOSTERISCHER
MODULATOREN VOM ALKAN-BISAMMONIUM-TYP: KONSEQUENZEN FÜR
DIE INTERAKTION MIT MUSKARINISCHEN ACETYLCHOLIN-REZEPTOREN
VOM SUBTYP M_2

DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES DOKTORGRADES (DR. RER. NAT.)

DER

MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT

DER

RHEINISCHEN FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT BONN

VORGELEGT VON

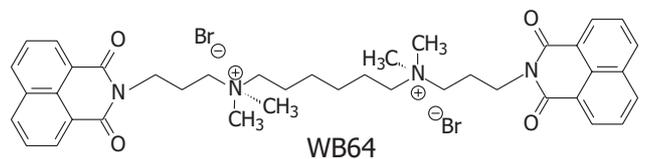
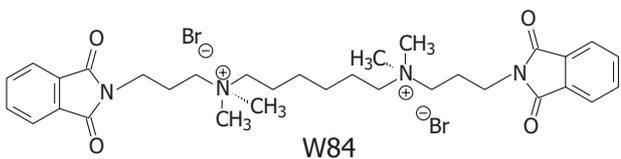
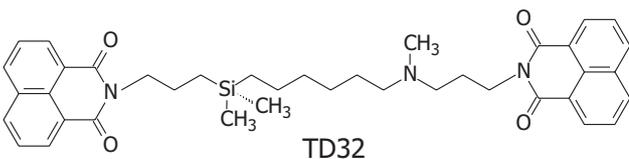
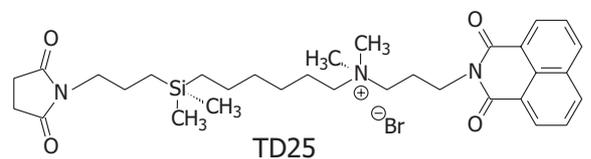
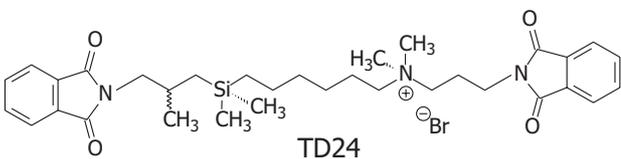
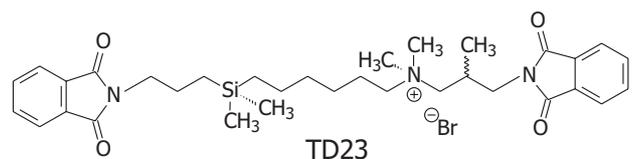
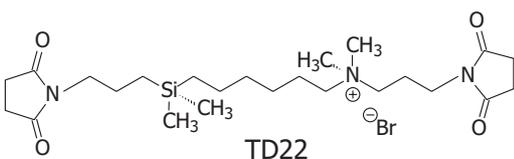
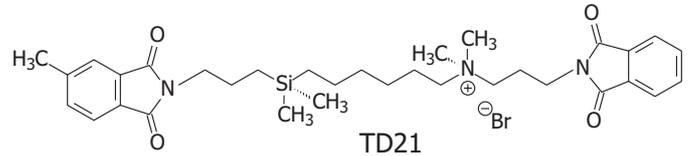
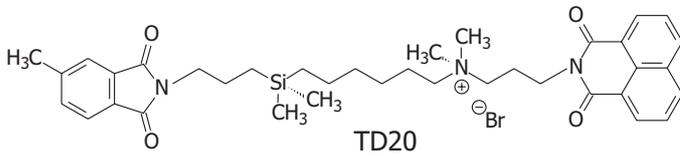
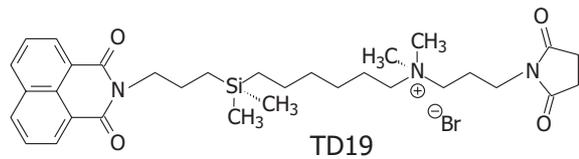
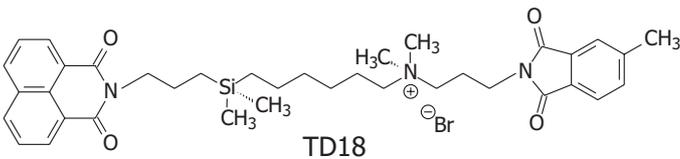
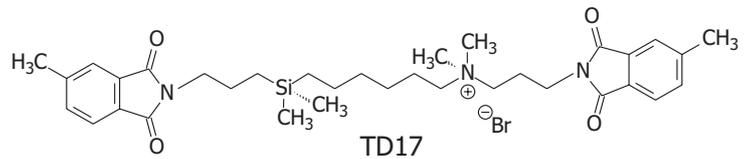
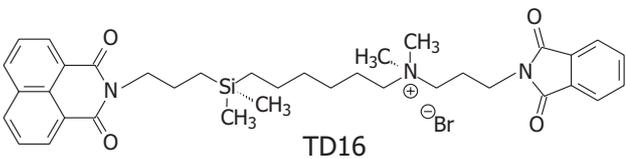
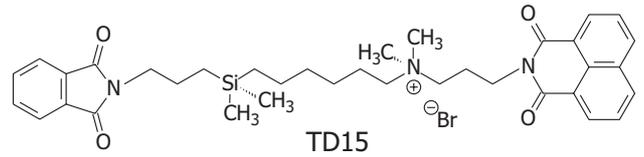
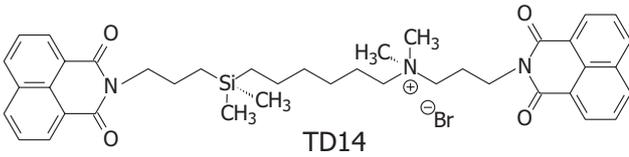
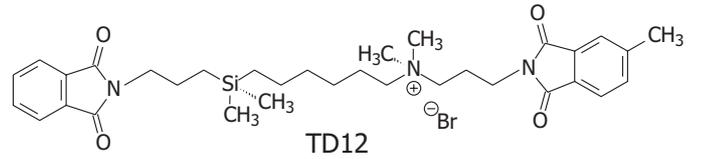
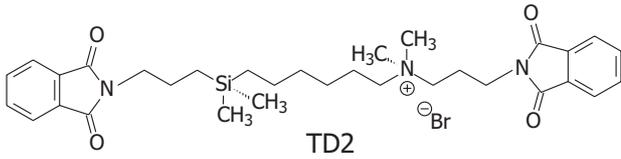
MARC ALBRECHT

AUS

SIEGBURG

BONN 2005

Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte allosterische Modulatoren



Die vorliegende Dissertationsschrift wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn in der Zeit von September 2001 bis April 2005 in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie des Pharmazeutischen Institutes unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. Klaus Mohr angefertigt. Sie ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter „http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online“ elektronisch publiziert. Erscheinungsjahr 2005.

Erstgutachter (Betreuer): Prof. Dr. Klaus Mohr

Zweitgutachter: Prof. Dr. Heinz Bönisch

Fachnahes Mitglied: Prof. Dr. Gerd Bendas

Fachangrenzendes Mitglied: Prof. Dr. Reinhold Tacke

Tag der Einreichung der vorliegenden Arbeit: 14. September 2005

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: 18. November 2005

Tag der Überreichung der Doktorurkunde:

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren	1
1.2 Allosterische Modulation von muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren.....	3
1.3 Aspekte des therapeutischen Einsatzes allosterischer Modulatoren ..	6
1.4 Allosterische Modulatoren muskarinischer Acetylcholin-Rezeptoren .	9
1.4.1 Verbindungen vom Alkan-Bisammonium-Typ	9
1.4.2 Silizium-haltige Verbindungen.....	11
1.5 Fragestellung.....	12
2 Methoden, Materialien, Reagenzien und Lösungen	14
2.1 Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe	14
2.1.2 Herstellung einer Membransuspension.....	14
2.1.2 Bestimmung des Proteingehaltes der Membransuspensionen ..	15
2.2 Klonierte Wildtyp- und punktmutierte Muskarin-Rezeptoren.....	16
2.2.1 Zellbiologische Arbeiten	16
2.2.1.1 Reaktivierung zuvor eingefrorener COS7-Zellen	17

2.2.1.2	Einfrieren von COS7-Zellen	18
2.2.2	Molekularbiologische Arbeiten	18
2.2.2.1	Plasmid-DNA-Gewinnung	19
2.2.2.2	Bestimmung von Gehalt und Reinheit der Plasmid-DNA...	20
2.2.2.3	Überführung und Verwendung der genetischen Informationen	21
2.2.2.3.1	Vorbereitung der COS7-Zellen	21
2.2.2.3.2	Transiente Transfektion	22
2.2.2.3.3	Präparation der Rezeptor-haltigen Membranen	23
2.3	Radioligand-Bindungsstudien	24
2.3.1	Theoretische Grundlagen	24
2.3.1.1	Allgemeine Zusammenhänge	24
2.3.1.2	Charakterisierung der Bindungseigenschaften einer Membransuspension	26
2.3.1.2.1	Homologe Konkurrenzexperimente	26
2.3.1.2.2	Bestimmung der fraktionellen Rezeptorbesetzung .	28
2.3.1.3	Heterologe Interaktionsexperimente	29
2.3.1.4	Kinetische Experimente	32
2.3.1.4.1	Aufnahme kompletter Dissoziationsverläufe	35
2.3.1.4.2	Zweipunkt-Dissoziationsexperimente	35
2.3.2	Durchführung der Untersuchungen	36
2.3.2.1	Untersuchungen unter Einsatz von Membransuspen- sionen aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe	37
2.3.2.1.1	Homologe Konkurrenzexperimente	38
2.3.2.1.2	Heterologe Interaktionsexperimente	39
2.3.2.1.3	Kinetische Experimente	41
2.3.2.2	Untersuchungen unter Einsatz von Membransuspen- sionen aus COS7-Zellen	43
2.4	Statistische Methoden	46
2.4.1	Arithmetisches Mittel	47
2.4.2	Standardabweichung	47
2.4.3	Standardfehler des Mittelwertes	48
2.4.4	F-Test	48

2.4.5	Ungepaarter t-Test	49
2.5	Eingesetzte Verbindungen	49
2.5.1	Orthosterische Muskarin-Rezeptor-Liganden	50
2.5.2	Allosterische Muskarin-Rezeptor-Liganden	51
2.5.2.1	Silizium-haltige Verbindungen	51
2.5.2.2	Alkan-Bisammonium-Verbindungen	52
2.6	Verwendete Materialien und Reagenzien	53
2.6.1	Materialien	53
2.6.2	Reagenzien	54
2.6.3	Kurzbeschreibungen der Herstellerfirmen	55
2.7	Verwendete Lösungen	56
2.8	Verwendete Computer-Programme	60
3	Ergebnisse	62
3.1	Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe	62
3.2	Beeinflussung der [³ H]NMS-Dissoziation sowie der [³ H]NMS-Gleichgewichtsbindung an M ₂ -Rezeptoren des Hausschwein-Herzens	65
3.2.1	Unsubstituierte Modulatoren	69
3.2.2	Methylphthalimid-substituierte Silizium-haltige Modulatoren	73
3.2.3	Zwischenketten-methylierte Silizium-haltige Modulatoren	76
3.2.4	Naphthalimid-substituierte Silizium-haltige Modulatoren	79
3.2.5	Lateral-asymmetrisch vergrößerte Silizium-haltige Modulatoren	85
3.2.6	Succinimid-substituierte Silizium-haltige Modulatoren	87
3.2.7	Silizium-haltiger Modulator ohne permanente Ladung	90
3.3	Epitopabhängigkeit der Affinität ausgewählter Modulatoren an [³ H]NMS-besetzten humanen M ₂ -Rezeptoren unter Verwendung von Membransuspensionen aus COS7-Zellen	93
3.3.1	Epitopabhängigkeit der Affinität von W84	95
3.3.2	Epitopabhängigkeit der Affinität von TD2	97
3.3.3	Epitopabhängigkeit der Affinität von TD14	99

3.3.4	Epitopabhängigkeit der Affinität von WB64.....	101
3.3.5	Epitopabhängigkeit der Affinität von TD15.....	102
3.3.6	Epitopabhängigkeit der Affinität von TD16.....	104
3.3.7	Epitopabhängigkeit der Affinität von TD32.....	106
4	Diskussion	112
4.1	Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Bindung Silizium-haltiger allosterischer Modulatoren an M ₂ -Rezeptoren des Hausschwein-Herzens unter Mg-Phosphat-Tris-Inkubationsbedingungen	112
4.1.1	Struktur-Wirkungs-Beziehungen an [³ H]NMS-besetzten M ₂ -Rezeptoren	113
4.1.2	Struktur-Wirkungs-Beziehungen an freien M ₂ -Rezeptoren	115
4.1.3	Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Kooperativität mit [³ H]NMS.....	117
4.2	Vergleich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Silizium-haltigen Verbindungen mit denen strukturell nahestehender Modulatoren....	119
4.2.1	Bedeutung der Kettenlänge für die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Silizium-haltigen Modulatoren	120
4.2.2	Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Silizium-haltigen Modulatoren im Vergleich zu analogen Alkan-Bisammonium-Substanzen.....	122
4.2.2.1	Einfluss lateraler Molekülvariationen	123
4.2.2.2	Einfluss verschiedener Zentralketten-Längen.....	126
4.3	Bedeutung der Zusammensetzung des Inkubationspuffers für die Affinität der Silizium-haltigen Modulatoren an [³ H]NMS-besetzten M ₂ -Rezeptoren.....	128
4.4	Epitopabhängigkeit der Bindung Silizium-haltiger Modulatoren an [³ H]NMS-besetzten humanen M ₂ -Rezeptoren unter Na-K-Phosphat-Inkubationsbedingungen	132
4.5	Vergleich der Epitopabhängigkeit der Bindung Silizium-haltiger Verbindungen mit derjenigen von Alkan-Bisammonium-Modulatoren....	136
4.6	Atypisches Verhalten der Silizium-haltigen Modulatoren	138

5 Zusammenfassung	140
6 Literaturverzeichnis	143
7 Anhang	157
8 Veröffentlichungen	161
8.1 Wissenschaftliche Originalarbeiten.....	161
8.2 Abstrakta und Kongressbeiträge.....	161

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren

Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren gehören zur größten Superfamilie von Rezeptoren, den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Christopoulos und Kenakin, 2002). Alle Rezeptoren dieser Familie bestehen aus einem langen Proteinfaden, der die Zellmembran siebenmal in Form von α -Helices durchzieht, wobei sich das N-terminale Ende auf der extrazellulären Seite befindet und das C-terminale Ende im Cytoplasma lokalisiert ist (Hulme et al., 1990; Wess, 1993). Die sieben hydrophoben transmembranären Domänen, die insgesamt durch jeweils drei extrazelluläre und intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind, weisen eine ringförmige Anordnung auf, in deren Mitte sich die Ligand-Bindungstasche befindet, die von der extrazellulären Seite zugänglich ist (Pogozheva et al., 1997; Palczewski et al., 2000). Über die dritte intrazelluläre Schleife erfolgt die Kontaktaufnahme mit dem G-Protein, das die nachgeschalteten Signaltransduktions-Mechanismen vermittelt.

Zum heutigen Zeitpunkt sind fünf verschiedene Subtypen des Muskarin-Rezeptors, $M_1 - M_5$, bekannt (Kubo et al., 1986; Bonner et al., 1987 und 1988). Ihnen gemeinsam ist der körpereigene Ligand Acetylcholin, welcher bei der Rezeptor-Bindung jeweils über seine polare Aminogruppe mit einem Asparagin in der dritten transmembranären Domäne interagiert (Spalding et al., 1994). Die verschiedenen Subtypen unterscheiden sich voneinander im Hinblick auf die Art der G-Protein-Kopplung, der nachgeschalteten Effektorproteine, ihrer Verteilung im menschlichen Körper sowie ihrer Funktionen auf zellulärer Ebene, die sie vermitteln. M_1 -, M_3 - und M_5 -Rezeptoren können über ein $G_{q/11}$ -Protein die Phospholipase C aktivieren, die in der Folge aus dem Zellmembran-Bestandteil Phosphatidylinositol die sekundären Botenstoffe Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) freisetzt. M_2 - und M_4 -Rezeptoren hemmen beispielsweise über ein $G_{i/o}$ -Protein die Adenylatcyclase, was die Konzentration des sekundären Botenstoffes cyclisches Adenosyl-Monophosphat (cAMP) absenkt (Richards, 1991; Caulfield, 1993; Felder, 1995).

Die Aufklärung des Verteilungsmusters der Muskarin-Rezeptor-Subtypen innerhalb des menschlichen Organismus kann anhand von verschiedenen Techniken erfolgen. Eine Möglichkeit ist die Quantifizierung der in einer Gewebeprobe enthaltenen mRNA der fünf Subtypen (Krejci und Tucek, 2002), weiterhin kann unter Verwendung von Subtyp-selektiven Antikörpern (Dörje et al., 1991; Levey et al., 1991) oder Subtyp-selektiven, radioaktiv markierten Liganden gearbeitet werden (Ferrari-Di Leo et al., 1994; Reeve et al., 1997). Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass M_1 -Rezeptoren vor allem in einigen Bereichen des Zentralnervensystems (Cortex und Hippocampus) exprimiert werden. M_2 -Rezeptoren liegen ebenfalls im Zentralnervensystem vor, darüber hinaus im Herzen sowie der glatten Muskulatur. Im zuletzt genannten Gewebe konnten auch M_3 -Rezeptoren nachgewiesen werden, sie sind überdies im exokrinen Drüsengewebe lokalisiert. Der M_4 - findet sich wie der M_5 -Rezeptor-Subtyp ebenfalls in größerer Zahl im Zentralnervensystem, der M_4 -Rezeptor hauptsächlich im Vorderhirn und dem Striatum und der M_5 -Subtyp im Wesentlichen in der Substantia nigra und dem Hippocampus (Caulfield und Birdsall, 1998).

Die weite Verbreitung der Rezeptor-Subtypen belegt ihren Stellenwert für die Regulation verschiedenster Körperprozesse. Über Muskarin-Rezeptoren ist in der Pe-

riperie eine Beeinflussung der Herztätigkeit, der Sekretion exokriner Drüsen oder der Kontraktion glatter Muskulatur möglich und im Zentralnervensystem spielen sie eine wichtige Rolle bei der Schmerzwahrnehmung, der Gedächtnisleistung, der Ausbildung und Umsetzung von Bewegungsbefehlen oder der Steuerung der Körpertemperatur (Caulfield und Birdsall, 1998; Birdsall et al., 2001; Duttaroy et al., 2002). Durch eine gezielte Beeinflussung von ausgewählten Körperprozesse ist es daher möglich, Fortschritte in der Behandlung von Schmerzzuständen, des Morbus Alzheimer, des Morbus Parkinson, der Schizophrenie, der chronisch obstruktiven Bronchitis sowie von Störungen der Herz- oder der Blasenfunktion zu erzielen (Friedhoff und Alpert, 1973; Gomeza et al., 1999; Birdsall et al., 2001; Eglén et al., 2001).

1.2 Allosterische Modulation von muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren

Mittlerweile ist es möglich, eine Vielzahl von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren allosterisch zu beeinflussen (Soudijn et al., 2001). Dies ist für die Muskarin-Rezeptoren am besten erforscht. Alle fünf Rezeptor-Subtypen besitzen neben der orthosterischen Bindungsstelle, die vom physiologischen Liganden Acetylcholin sowie von konventionellen Agonisten und Antagonisten wie Carbachol, Atropin oder Scopolamin verwendet wird, ein weiteres, spezifisches Haftareal, das als allosterische Bindungsstelle bezeichnet wird (Lazareno und Birdsall, 1995; Holzgrabe und Mohr, 1998). Dieses zusätzliche Haftareal befindet sich oberhalb der orthosterischen Bindungsstelle in einem weiter extrazellulär gelegenen Bereich des Rezeptorproteins (Ellis et al., 1993; Voigtländer et al., 2003). Die nachfolgende Abbildung 1.1 veranschaulicht schematisch die Lage dieser beiden Bindungsstellen an Muskarin-Rezeptoren.

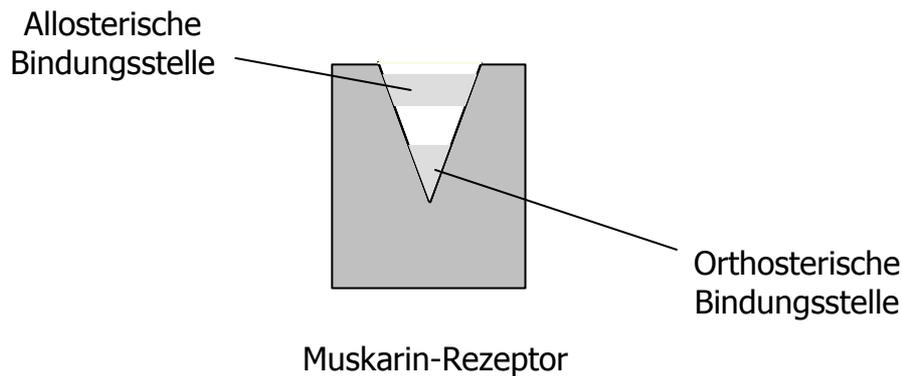


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Lage der allosterischen sowie der orthosterischen Bindungsstelle an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren.

Aufgrund der allosterischen Bindungsstelle sind alle fünf Subtypen des Muskarin-Rezeptors allosterisch modulierbar (Ellis et al., 1991; Jakubik et al., 1995; Christopoulos et al., 1999). Dies bedeutet, dass sich orthosterische und allosterische Liganden wechselseitig im Bezug auf ihre Affinität zur jeweiligen Bindungsstelle beeinflussen können. Aufgrund der unterschiedlichen Haftareale kommt es dabei nicht zu einer kompetitiven, sondern zu einer kooperativen Interaktion (Christopoulos und Kenakin, 2002).

Nach der Zugabe eines orthosterischen Liganden zu Muskarin-Rezeptoren stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht aus Ligand-Rezeptor-Komplexen sowie frei vorliegenden Rezeptoren und Orthoster-Molekülen ein. Allosterische Modulatoren können die Lage dieses Bindungsgleichgewichtes verändern. Sie beeinflussen sowohl die Assoziation als auch die Dissoziation des Orthosters und das Verhältnis der beiden Prozesse zueinander bestimmt den Effekt des Modulators auf die Orthoster-Gleichgewichtsbindung (Jepsen et al., 1988; Schröter et al., 2000). Durch die Besetzung des freien Rezeptors mit einem Alloster kommt es zu einer Hemmung der Orthoster-Assoziation, und aus der Alloster-Bindung an einen Rezeptor, dessen orthosterische Bindungsstelle besetzt ist, resultiert eine Unterdrückung der Orthoster-Dissoziation. Dabei sind, basierend auf den Eigenschaften des Modulators, drei sich prinzipiell voneinander unterscheidende Arten der Interaktion denkbar, die mit Abbildung 1.2 veranschaulicht werden sollen.

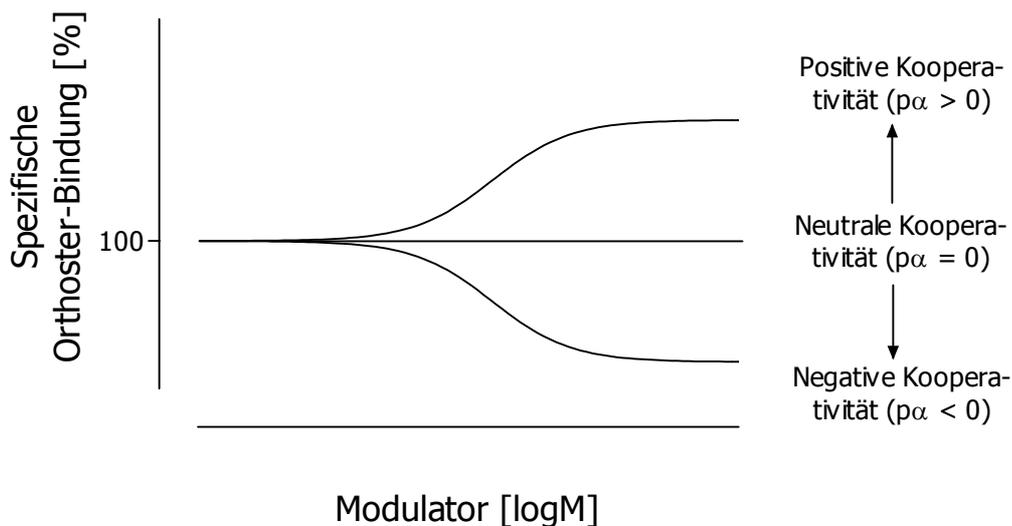


Abbildung 1.2: Illustration der Beeinflussung der Orthoster-Gleichgewichtsbindung durch einen positiv, neutral, oder negativ kooperativ wirkenden Modulator. *Ordinate:* Spezifische Orthoster-Bindung in Prozent bezogen auf dessen spezifische Bindung in Abwesenheit eines Modulators; *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Modulator-Konzentration. Weitere Erläuterungen finden sich im Text.

Besitzt ein Modulator eine höhere Affinität zu Orthoster-besetzten als zu freien Rezeptoren, hemmt er die Dissoziation stärker als die Assoziation und das Ausmaß der Orthosterbindung wird erhöht. Dies wird als positive Kooperativität des Modulators gegenüber dem orthosterischen Liganden bezeichnet und ist in Abbildung 1.2 durch die nach oben gerichtete Konzentrations-Effekt-Kurve dargestellt. Ausgehend von dem auf 100 % festgesetzten Bezugswert in Abwesenheit eines allosterischen Modulators kann das Ausmaß der Bindungsförderung durch den Parameter $p\alpha$ quantifiziert werden, der für positiv kooperative Modulatoren ein positives Vorzeichen aufweist. α ist der Kooperativitätsfaktor des ternären Modells allosterischer Interaktionen (Ehlert; 1988) und $p\alpha$ ist der negative dekadische Logarithmus von α .

Im umgekehrten Fall ist die Affinität des Modulators zu freien Rezeptoren größer als zu besetzten und es wird bevorzugt die Orthoster-Assoziation unterdrückt. Daraus resultiert eine Verminderung der Orthoster-Gleichgewichtsbindung (untere Kurve in Abbildung 1.2), was einer negativen Kooperativität entspricht. Der $p\alpha$ -Wert solcher Verbindungen ist negativ. Ein typisches Charakteristikum allosterischer Interaktionen mit negativ kooperativen Modulatoren ist ein unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve, das signifikant höher als 0 % liegt. Im Gegensatz

dazu wird das Niveau der spezifischen Orthoster-Bindung auf 0 % abgesenkt, wenn sich eine Testsubstanz kompetitiv gegenüber dem Orthoster verhält.

Einen Sonderfall stellt die neutrale Kooperativität dar, bei der es keinen Unterschied in der Modulator-Affinität zwischen besetzten und freien Rezeptoren gibt. Die Assoziations- und die Dissoziationshemmung entsprechen sich und in der Folge bleibt die Lage des Bindungsgleichgewichtes des orthosterischen Liganden trotz Zugabe steigender Konzentrationen des Allostere unverändert (mittlere Kurve in Abbildung 1.2; Kostenis und Mohr, 1996b). Der $p\alpha$ -Wert von neutral kooperativen Verbindungen ist gleich Null.

Es sei angemerkt, dass die Art der Kooperativität generell abhängig ist vom Rezeptor-Subtyp, vom orthosterischen Liganden sowie vom allosterischen Modulator (Lee und El-Fakahany, 1988).

1.3 Aspekte des therapeutischen Einsatzes allosterischer Modulatoren

Die Bedeutung der Muskarin-Rezeptoren innerhalb verschiedenster Körperprozesse eröffnet eine Reihe von therapeutischen Perspektiven (siehe 1.1). Es wurde daher in zahlreichen Forschungsbestrebungen versucht, über die Entwicklung Subtyp-selektiver Verbindungen gezielt Einfluss auf ausgewählte Prozesse zu nehmen, was eine nebenwirkungsärmere Arzneimitteltherapie ermöglichen würde. Die fünf Rezeptor-Subtypen weisen jedoch vor allem im Bereich der Acetylcholin-Bindungsstelle eine ausgeprägte Sequenz-Homologie auf (Bonner, 1989; Hulme et al., 1990), so dass bis heute keine Agonisten oder Antagonisten zu Verfügung stehen, die ihre Wirkung nur an einem einzigen Rezeptor-Subtyp vermitteln (absolute Subtyp-Selektivität; Felder et al., 2000). Die zur Zeit verfügbaren Verbindungen besitzen lediglich eine unterschiedliche Affinität zu den einzelnen Muskarin-Rezeptoren, so dass sich die Substanz in therapeutischer Dosierung bevorzugt an einen Subtyp anlagert. Mit zunehmender Wirkstoff-Konzentration nimmt jedoch die Selektivität ab und bei ausreichend hohen Konzentrationen werden alle fünf Subtypen gleichermaßen beeinflusst (relative Subtyp-Selektivität). Dies trifft auch

auf die im vergangenen Jahr in den deutschen Markt eingeführten antagonistischen Arzneistoffe Darifenacin (Emselex[®]) und Solifenacin (Vesikur[®]) zu, die zur Therapie der Reizblase indiziert sind. Im Vergleich zu den bisher üblicherweise verwendeten Substanzen Oxybutynin (z.B. Oxybutanon[®]), Tolterodin (Detrusitol[®]) und Trosipium (z.B. Spasmex[®]) sollen die neuen Substanzen eine etwas höhere relative Subtyp-Selektivität gegenüber dem M₃-Rezeptor und deshalb eine bessere Verträglichkeit aufweisen (Ikeda et al., 2002; Nelson et al., 2004). Der 2002 zur Behandlung der chronisch obstruktiven Bronchitis zugelassene Rezeptor-Antagonist Tiotropium (Spiriva[®]) verfügt ebenfalls nicht über eine absolute Subtyp-Selektivität. Eine bevorzugte Wirkung am M₃- gegenüber dem M₂-Subtyp aufgrund einer schnelleren Dissoziation von M₂-Rezeptoren ist in vitro darstellbar (Barnes, 2000).

Die meisten der heute bekannten allosterischen Liganden weisen ebenfalls eine relative Subtyp-Selektivität auf, sie besitzen typischerweise die höchste Affinität zu M₂- und die niedrigste zu M₅-Rezeptoren (Ellis et al., 1991; Ellis und Seidenberg, 2000; Buller et al., 2002). Dennoch verfügen allosterische Modulatoren über das Potential zu größerer Selektivität, da die Sequenz-Homologie der fünf Subtypen innerhalb der allosterischen Bindungsstelle im Vergleich zum orthosterischen Haftareal deutlich geringer ausgeprägt ist (Tucek und Proska, 1995). Darüber hinaus ergibt sich aus dem allosterischen Prinzip eine weitere Möglichkeit, wie absolute Subtyp-Selektivität zustande kommen kann. In diesem Fall weist ein Modulator an einem Subtyp positive oder negative Kooperativität mit dem physiologischen Liganden Acetylcholin auf und verhält sich an den übrigen Subtypen neutral kooperativ gegenüber Acetylcholin. Dadurch wird die Bindung des Acetylcholins nur an einem Rezeptor-Subtyp verändert (Birdsall et al., 1997).

Neben einer erleichterten Entwicklung von Subtyp-selektiven Arzneistoffen ergeben sich aus dem Prinzip der allosterischen Modulation weitere therapeutische Vorteile. Der Effekt eines Modulators ist von Art und Ausmaß der Kooperativität mit Acetylcholin abhängig. Daraus ergibt sich, dass die Wirkung selbstlimitierend ist (Lüllmann et al., 1969), was die Gefahr einer Intoxikation nach Überdosierung reduziert (Holzgrabe und Mohr, 1998). Die bemerkenswerte Möglichkeit der Förderung der Acetylcholin-Bindung durch einen allosterischen Modulator eröffnet interessante Perspektiven in der Therapie von Krankheitsbildern, die auf eine vermin-

derte cholinerge Aktivität zurückgehen. Im Gegensatz zu Muskarin-Rezeptor-Agonisten sind positiv kooperative Modulatoren in der Lage, die Rezeptorerregung gezielt nur an denjenigen Synapsen zu verstärken, an denen Acetylcholin freigesetzt wird. Durch den Modulator kann so auch das physiologische Muster einer wechselnden Rezeptorerregung erhalten werden, was mit Rezeptor-Agonisten, die eine Dauerstimulation des Rezeptors bewirken, nicht möglich ist.

Trotz dieser Vorteile finden sich im derzeitigen Arzneischatz nur wenige allosterische Modulatoren, die vor allem Ligand-gesteuerte Ionenkanäle betreffen. Deren prominenteste Vertreter sind die Benzodiazepine, die vorwiegend als Antikonvulsiva, Anxiolytika, Sedativa oder Myotonolytika eingesetzt werden. Benzodiazepine interagieren positiv kooperativ mit dem inhibitorischen Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) im Zentralnervensystem. Durch die Förderung der GABA-Bindung am GABA_A-Rezeptor, einem Ligand-gesteuerten Ionenkanal, kommt es über den erhöhten Einfluss inhibitorischer Neurone zu einer Dämpfung der Aktivität des Zentralnervensystems (Allan und Harris, 1986; Sieghart, 1992). Galantamin (Reminyl[®]), ein Antidementivum, das zur Therapie leichter bis mittelgradiger Formen des Morbus Alzheimer indiziert ist, vermittelt einen Teil seiner Wirkung durch allosterische Modulation. Neben der Hemmung der Acetylcholinesterase fördert es die Bindung des physiologischen Transmitters an nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren, was die Aktivität des cholinergen Systems erhöht (Maelicke et al., 2000; Santos et al., 2002). Darüber hinaus wird für zahlreiche Inhalations- und Injektionsnarkotika ebenfalls ein allosterischer Wirkungsmechanismus diskutiert, bei dem die GABA_A-Rezeptoren vermutlich eine zentrale Rolle einnehmen (Krasowski und Harrison, 1999).

Das Calcimimetikum Cinacalcet (Mimpara[®]), das 2004 für den deutschen Markt zugelassen wurde, verstärkt die Wirkung von Calcium-Ionen an Calcium-sensitiven Rezeptoren der Nebenschilddrüse, die wie die Muskarin-Rezeptoren zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren zählen. Dies vermindert die Freisetzung von Parathormon, was sich günstig auf die Krankheitsbilder des primären und des sekundären Hyperparathyreoidismus sowie des Nebenschilddrüsen-Karzinoms auswirkt (Block et al., 2004; de Francisco, 2005; Peacock et al., 2005).

1.4 Allosterische Modulatoren muskarinischer Acetylcholin-Rezeptoren

1.4.1 Verbindungen vom Alkan-Bisammonium-Typ

Um die in 1.3 erläuterten therapeutischen Vorteile der allosterischen Modulation muskarinischer Acetylcholin-Rezeptoren erreichen zu können, wurden in der Vergangenheit viele Substanzen entwickelt und auf ihre modulierenden Eigenschaften hin untersucht. Zu den am intensivsten beforschten Substanzen zählen dabei die Verbindungen vom Alkan-Bisammonium-Typ (z.B. Kostenis et al., 1994; Staudt et al., 1998; Nassif-Makki et al., 1999; Bender et al., 2000; Botero Cid et al., 2000; Holzgrabe et al., 2000; Li et al., 2001; Balatkova, 2002; Raasch et al., 2002; Gilsbach et al., 2003; Mohr et al., 2003; Muth et al., 2003; Muth et al., 2005). Der Prototyp-Modulator W84 ist der Hauptvertreter dieser Substanz-Klasse, seine Struktur ist in Abbildung 1.3 gezeigt.

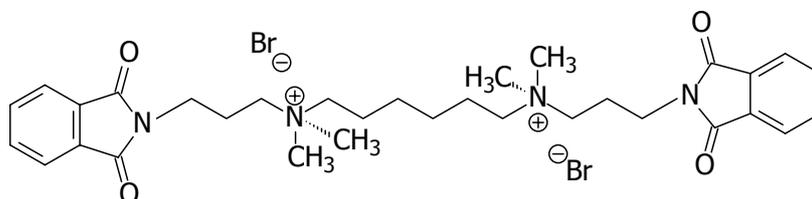


Abbildung 1.3: Strukturformel des Prototyp-Modulators W84 aus der Gruppe der Verbindungen vom Alkan-Bisammonium-Typ.

Wie zahlreiche andere Modulatoren weist W84 die höchste Affinität zum M_2 - und die niedrigste Affinität zum M_5 -Subtyp auf, wenn die Rezeptoren mit dem Antagonisten N-Methylscopolamin (NMS) besetzt sind (Ellis et al., 1991; Ellis und Seidenberg, 2000; Buller et al., 2002). In den vergangenen Jahren ist es gelungen, diesen Affinitätsunterschied von etwa zwei Dekaden auf molekularer Ebene zu erklären. Im Gegensatz zum M_5 -Rezeptor enthält der M_2 -Subtyp die Aminosäuren 177 Tyrosin und 423 Threonin, die innerhalb der zweiten extrazellulären Schleife bzw. am Beginn der siebten transmembranären Domäne lokalisiert sind. Werden diese

beiden Epitope durch die jeweils korrespondierende Aminosäure des M₅-Rezeptors ersetzt, entsteht eine Rezeptor-Doppelmutante, zu der W84 eine identische Affinität hat wie zum M₅-Subtyp (Buller et al., 2002; Voigtländer et al., 2003). Diese beiden Aminosäuren sind demnach an der Ausbildung des Haftareals von W84 an NMS-besetzten M₂-Rezeptoren beteiligt. Anhand von Antagonismus-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass viele andere, strukturell deutlich abweichende Modulatoren dasselbe Haftareal wie W84 verwenden, weshalb es als „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“ bezeichnet wird (Ellis und Seidenberg, 1992; Tränkle und Mohr, 1997).

Auf der Basis der experimentellen Befunde von W84 entwickelten Jöhren und Höltje (2002) ein dreidimensionales Modell des Antagonist-besetzten M₂-Rezeptors, das in Abbildung 1.4 dargestellt ist.

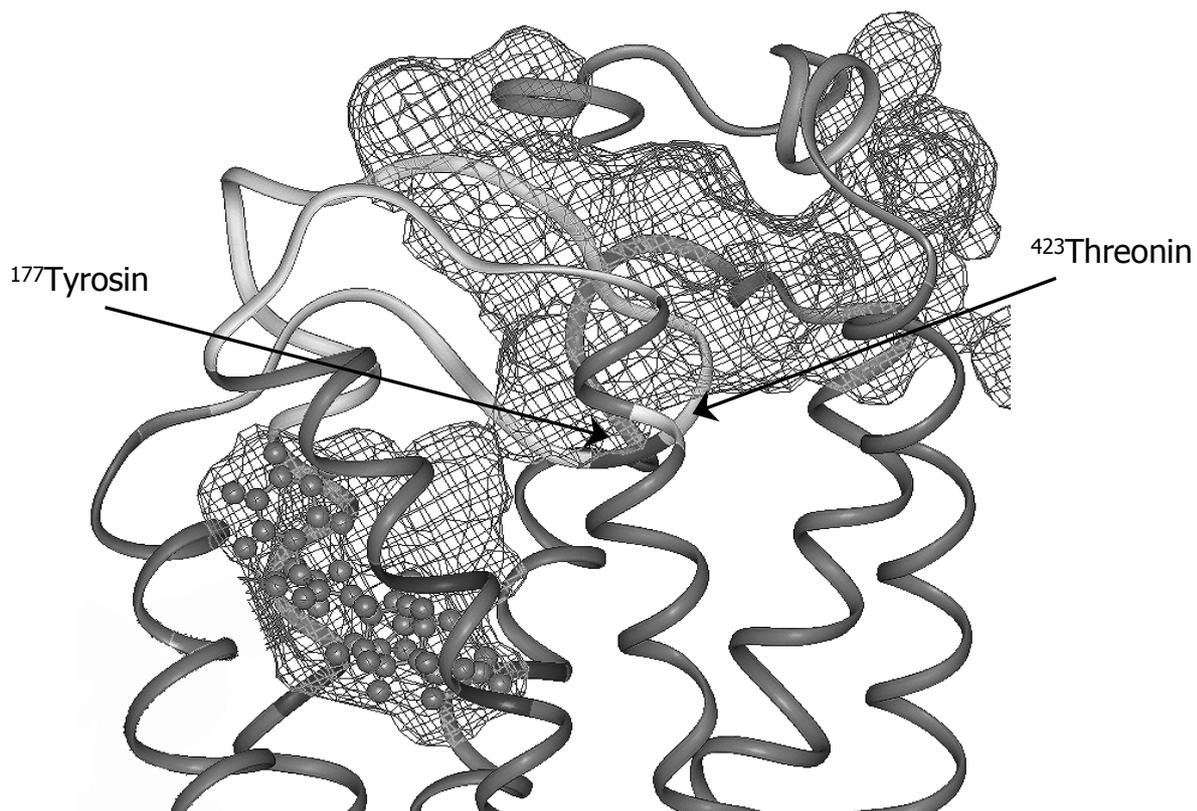


Abbildung 1.4: Modell des *N*-Methylscopolamin (NMS)-besetzten M₂-Rezeptors. Die sieben transmembranären Domänen sind dunkelgrau dargestellt, das N-terminale Ende (oben rechts) mittelgrau und die extrazellulären Schleifen hellgrau. Die Gitternetzlinien symbolisieren das freie Volumen innerhalb des Rezeptorproteins. Der Ligand NMS ist die orthosterische Bindungsstelle eingepasst (unten links), das allosterische Haftareal ist frei (oben rechts). Die Position der Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin, die an der Ausbildung der allosterischen Bindungsstelle von W84 beteiligt sind, ist durch Pfeile markiert (nach Jöhren und Höltje, 2002, und Voigtländer et al., 2003).

Die Kooperativität der verschiedenen Alkan-Bisammonium-Modulatoren mit NMS an M₂-Rezeptoren, die zumeist in einem Mg-Phosphat-Tris-Puffersystem bei pH 7,3 und 37 °C untersucht wurde, ist abhängig von der molekularen Struktur. W84 sowie diejenigen Derivate, die aus einer Veränderung der endständigen Phthalimid-Gruppen hervorgegangen sind, weisen eine höhere Affinität zu freien als zu besetzten Rezeptoren auf und sind dadurch negativ kooperativ (siehe 1.2), demgegenüber besitzen W84-Derivate, die ein- oder mehrfach im Bereich der Molekülkette zwischen den beiden lateralen Resten methyliert wurden, ein umgekehrtes Affinitäts-Verhältnis, weshalb sie sich positiv kooperativ verhalten (Balatkova, 2002; Raasch et al., 2002; Muth et al., 2003).

1.4.2 Silizium-haltige Verbindungen

Die Alkan-Bisammonium-Substanzen sind aufgrund von zwei quartären Stickstoffen permanent positiv geladen. Diese Strukturelemente, die längere Zeit als essentiell angesehen wurden (Holzgrabe et al., 1996a und b), schränken das therapeutische Potential dieser Modulatoren jedoch stark ein, da sie vermutlich eine Überwindung biologischer Barrieren wie die Blut-Hirn-Schranke verhindern. Um vor diesem Hintergrund eine Verbesserung zu erzielen, wurde von Daiss (2004) ein quartärer Stickstoff von W84 durch ein Silizium-Atom ausgetauscht. Es resultierte mit TD2 der erste Vertreter der sogenannten Silizium-haltigen Verbindungen, dessen Struktur in Abbildung 1.5 dargestellt ist.

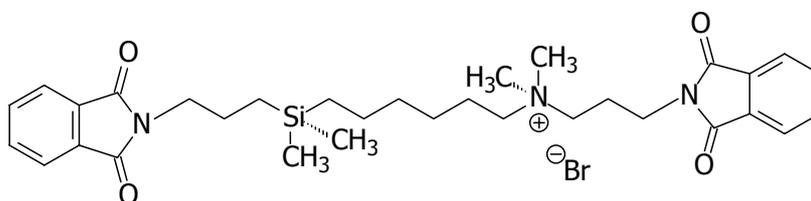


Abbildung 1.5: Strukturformel von TD2, dem ersten Vertreter der Silizium-haltigen Verbindungen.

Der singuläre Atom-Austausch hat die Kooperativität mit NMS bemerkenswerterweise von negativ nach positiv umgekehrt (Daiss et al., 2002). Dafür verantwort-

lich ist eine signifikante Erhöhung der Affinität zu besetzten Rezeptoren, die nun diejenige zu freien Rezeptoren, die unverändert geblieben ist, übersteigt. TD2 unterdrückt bevorzugt die Orthoster-Dissoziation und fördert daher die NMS-Gleichgewichtsbindung.

Eine Substanz, die basierend auf W84 aus einem zweifachen N⁺/Si-Austausch hervorgegangen ist, besitzt hingegen keinerlei Affinität zu NMS-besetzten Rezeptoren (Daiss et al., 2002). Für die Rezeptor-Interaktion scheint somit eine positive Ladung zwingend erforderlich zu sein.

1.5 Fragestellung

In der Folgezeit wurden einige weitere Silizium-haltige Verbindungen auf ihre allosterischen Eigenschaften hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass nahezu alle von ihnen die NMS-Bindung fördern, was im klaren Gegensatz zu den struktur-analogen Alkan-Bisammonium-Verbindungen steht, welche die NMS-Bindung ausnahmslos absenken. Es scheint somit allein durch den N⁺/Si-Austausch zu einem grundlegend veränderten allosterischen Verhalten gekommen zu sein.

Diese Hypothese wurde im ersten Teil dieser Arbeit geprüft, indem für vierzehn, durch strukturelle Variationen von TD2 hervorgegangene Verbindungen die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Silizium-haltigen Modulatoren charakterisiert und mit denjenigen verglichen wurden, die für die Alkan-Bisammonium-Substanzen bekannt sind. Unter diesen Verbindungen befand sich auch die Substanz TD32, die statt des quartären einen tertiären Stickstoff enthält, der unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegt. Mit Hilfe von TD32 sollte überprüft werden, ob für die Rezeptor-Interaktion eine temporäre anstelle einer permanenten positiven Ladung ausreichend ist (vergleiche 1.4).

Die Untersuchungen wurden durchgeführt in Form von Radioligand-Bindungsstudien mit dem Radioorthoster [³H]NMS unter Verwendung von Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe, dessen Muskarin-Rezeptoren zu über 90 % vom M₂-Subtyp sind (Kreji und Tucek, 2002). Anhand von kinetischen Studien, welche die Beeinflussung der [³H]NMS-Dissoziation durch die Testsub-

stanzen erfassten, wurde deren Affinität zu Antagonist-besetzten Rezeptoren ermittelt. Weiterhin wurde der Einfluss auf die [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung untersucht, woraus sich Aussagen zur Modulator-Affinität zu freien Rezeptoren sowie zur Kooperativität ableiten lassen.

Ein Vergleich der experimentellen Befunde mit den Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Alkan-Bisammonium-Verbindungen (z.B. Muth et al., 2003) ergab, dass die allosterischen Eigenschaften beider Modulator-Klassen grundlegend voneinander abweichen. Aus diesem Grund wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, ob es durch den N⁺/Si-Austausch zu einer veränderten Interaktion mit dem M₂-Rezeptor und somit zu einem Wechsel derjenigen Rezeptorepitope kommt, die für die M₂/M₅-Selektivität verantwortlich sind. Dazu wurden geklonte humane M₂- und M₅-Wildtyp-Rezeptoren sowie punktmutierte M₂-Rezeptoren eingesetzt, in denen M₂¹⁷⁷Tyrosin und/oder M₂⁴²³Threonin, die sich als essentielle Epitope für die M₂/M₅-Selektivität von W84 herausgestellt haben (siehe 1.4.1), gegen die jeweils korrespondierende Aminosäure des M₅-Subtyps ausgetauscht wurden. Im Rahmen von kinetischen Untersuchungen wurden die Affinitäten ausgewählter Silizium-haltiger Modulatoren zu diesen, mit [³H]NMS besetzten Rezeptoren bestimmt und die Ergebnisse mit den Befunden verglichen, die für verschiedene Alkan-Bisammonium-Verbindungen vorliegen (Raasch, 2003; Voigtländer et al., 2003). Es zeigte sich, dass der Austausch eines quartären Stickstoffes durch ein Silizium-Atom zu einer grundlegenden Änderung der Epitopabhängigkeit an M₂-Rezeptoren führt.

Kapitel 2

Methoden, Materialien, Reagenzien und Lösungen

Im nachfolgenden Kapitel werden die Methoden dargestellt, mit welchen die in Kapitel 3 dargestellten Ergebnisse erhoben wurden. Die dabei eingesetzten Materialien („M“), Reagenzien („R“) und Lösungen („L“) sind am Ende dieses Kapitels, unter 2.6 und 2.7, in übersichtlicher Form aufgeführt.

2.1 Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe

2.1.1 Herstellung einer Membransuspension

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Großteil der Ergebnisse unter Verwendung von Membransuspensionen erzielt, die aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe

präpariert wurden. Da die Herstellungstechniken bereits an anderen Stellen detailliert beschrieben wurden (z.B. Tränkle et al., 1996; Dittmann, 2003), sollen sie hier nur kurz wiedergegeben werden.

Die ganz frischen Hausschwein-Herzen wurden über den Schlachthof Köln bezogen. Sie wurden in einzelne Gewebestücke portioniert und bis zur Weiterverarbeitung bei – 80 °C gelagert. Die eigentliche Präparation wurde in einer Kühlkammer bei 4 °C durchgeführt. Das etwas angetaute und mit einem Wiegemesser grob zerkleinerte Ventrikel-Gewebe (ca. 40 g) wurde dafür zunächst zweimal mit ca. 20 ml einer 0,32 M Saccharose-Lösung (L1) gespült, um anhaftende Blutreste zu entfernen, und anschließend in 800 ml frischer Saccharose-Lösung (ca. 20 ml/g Feuchtgewicht des Herzgewebes) erst in einem Waring-Blendor-Homogenisator (M1) und dann in einem Potter-Elvehjem-Glashomogenisator (M2) fein zerkleinert. Die erhaltene Suspension wurde anschließend für 11 min bei 4 °C und 2000 rpm zentrifugiert (M3, Beckman Rotor-Typ 35), die entstandenen Pellets wurden verworfen. Der Überstand wurde erneut (41 min, 4 °C und 32000 rpm) zentrifugiert, der Überstand wurde sodann verworfen. Die als Pellet gesammelten, gewünschten Membranfragmente wurden in etwa 120 ml (ca. 3 ml/g Feuchtgewicht des Herzgewebes) 50 mM Tris-HCl-Puffer (L2) aufgenommen und erneut für kurze Zeit im Glashomogenisator zur Erzielung einer einheitlichen Suspension homogenisiert. Aliquota mit 0,5 und 1 ml wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße (M4) überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und abschließend bis zur experimentellen Verwendung bei – 80 °C aufbewahrt.

2.1.2 Bestimmung des Proteingehaltes der Membransuspensionen

Der Proteingehalt der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt, wobei als Standard-Substanz humanes (R4) Serumalbumin eingesetzt wurde.

Über den Proteingehalt der in dieser Arbeit hergestellten Membranpräparationen gibt Tabelle 2.1 Auskunft. Der gemittelte Proteingehalt aller Suspensionen betrug $5,61 \pm 0,79$ mg Protein/ml Membransuspension (Mittelwert \pm S.E.M, n = 11).

Membransuspension (Tag der Präparation)	Proteingehalt [mg/ml Membransuspension]
24.09.2001	4,43 ± 0,18
24.01.2002	2,42 ± 0,07
20.02.2002	8,19 ± 0,93
13.05.2002	2,77 ± 0,30
20.06.2002	1,15 ± 0,40
10.07.2002	7,42 ± 0,78
04.12.2002	4,65 ± 0,23
24.02.2003	6,77 ± 0,65
08.05.2003	7,47 ± 0,59
10.06.2003	8,25 ± 0,81
27.10.2003	8,16 ± 0,82

Tabelle 2.1: Proteingehalte der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler von drei unabhängigen Doppelbestimmungen.

2.2 Klonierte Muskarin-Wildtyp- und punktmutierte Rezeptoren

2.2.1 Zellbiologische Arbeiten

Für die zellbiologischen Tätigkeiten im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Linie von COS7-Zellen verwendet. Es handelt sich dabei um embryonale Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*), die in Kultur eine einschichtige Zelllage ausbilden. Mit ihrer Hilfe wurden die Rezeptor-Proteine exprimiert, die in dieser Arbeit (siehe 3.4) Verwendung fanden. Die dazu benötigte genetische Information befand sich auf Plasmid-DNA, die mittels molekularbiologischer Techniken gewonnen (siehe 2.2.2.1) und in COS7-Zellen transfiziert (siehe 2.2.2.3.2) wurde.

Sämtliche Arbeiten an lebenden COS7-Zellen wurden unter aseptischen Bedingungen unter Verwendung einer Werkbank mit laminarem Luftstrom (M5) durchgeführt. Die sich in Kultur befindlichen Zellen wurden zur Vermehrung in einem Brutschrank (M6) bei 37 °C mit einer 5 %igen CO₂-Begasung sowie einer Luftfeuchtig-

keit von 96 % aufbewahrt. Als Nährmedium wurde Dulbecco´s Modified Eagles Medium (R5) mit einem Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (R6) und 1 % eines Gemisches aus Penicillin und Streptomycin (R7) verwendet.

Nachdem die Zellen in einer großen Kulturschale (M7) eine Konfluenz von etwa 80 % erreicht hatten, was etwa alle zwei bis drei Tage der Fall war, wurden sie im Verhältnis von etwa 1:3 bis 1:4 auf neue Kulturschalen verteilt. Zu diesem Zweck wurde zunächst das alte Nährmedium abgesaugt und der Zellrasen vorsichtig mit 15 ml 37 °C warmem PBS-Puffer (L3) gewaschen, um noch anhaftende Reste des Nährmediums zu entfernen. Der Zusatz von 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (R9) initiierte den Ablösungsprozess der Zellen. Nach etwa fünfminütiger Einwirkzeit erfolgte die Inaktivierung von Trypsin-EDTA mittels frischem Nährmedium im Volumen-Verhältnis von mindestens 1:1. Die erhaltene Zellsuspension wurde auf neue große Kulturschalen verteilt, wobei das zugesetzte Volumen an Nährmedium so gewählt wurde, dass jede große Kulturschale mit etwa 30 ml Gesamtvolumen beschickt wurde. Zur anschließenden Zellvermehrung wurden sie erneut im Brutschrank aufbewahrt.

2.2.1.1 Reaktivierung zuvor eingefrorener COS7-Zellen

Zu Beginn eines neuen zellbiologischen Arbeitszyklus wurden zuvor bei – 80 °C eingefrorene COS7-Zellen (siehe 2.2.1.2) durch Ausfrieren reaktiviert. Dazu wurde der Inhalt eines Kryoröhrchens (M9) langsam auf Raumtemperatur erwärmt und quantitativ in ein mit 10 ml frischem Nährmedium befülltes Falcon-Gefäß (M10) überführt. Nach erfolgter Zentrifugation (M11) für 4 min bei Raumtemperatur und 1000 x g wurde das überstehende Nährmedium vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 15 ml frischem Nährmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in eine kleine Kulturschale (M12) überführt und sodann im Brutschrank aufbewahrt.

Nach etwa zwölf Stunden waren die Zellen angewachsen und hatten nach weiteren zwei bis drei Tagen eine ausreichende Konfluenz zur erstmaligen Aufteilung auf große Kulturschalen erreicht. Dazu wurden die unter 2.2.1 beschriebenen Arbeitsschritte durchgeführt, wobei jedoch bedingt durch die kleine Kulturschale, in

der die Zellen angewachsen waren, auf etwa zwei Drittel reduzierte Volumina eingesetzt wurden.

2.2.1.2 Einfrieren von COS7-Zellen

In unregelmäßigen Abständen ist es nötig, einen Anteil der sich in Kultur befindlichen COS7-Zellen zur dauerhaften Aufbewahrung einzufrieren, um einen ausreichenden Vorrat sicherzustellen. Dazu wurden die Zellen einer großen Kulturschale nach dem unter 2.2.1 beschriebenen Verfahren von altem Nährmedium befreit und vom Schalengrund abgelöst. Die Trypsin-EDTA-haltige Zellsuspension wurde in ein zuvor mit 5 ml Nährmedium beschicktes Falcon-Gefäß überführt und für 4 min bei Raumtemperatur und 1000 x g zentrifugiert. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 3 ml Nährmedium resuspendiert. Aliquota von 900 µl wurden zusammen mit 100 µl DMSO (R10) in ein Kryoröhrchen überführt und zügig bei – 80 °C bis zur erneuten Reaktivierung (siehe 2.2.1.1) eingefroren.

2.2.2 Molekularbiologische Arbeiten

Die molekularbiologischen Arbeiten dienten dem Ziel der Erzeugung ausreichender Mengen genetischen Materials in Form von Plasmid-DNA, welches nachfolgend transient in COS7-Zellen transfiziert wurde (siehe 2.2.2.3.2). Eingesetzt wurden Okayama/Berg pcD-Plasmide (Okayama und Berg, 1983), deren Gewinnung von Bonner et al. (1987, 1988) beschrieben wurde. Sie enthalten jeweils die Gene zur Exprimierung des humanen M₂- bzw. M₅-Wildtyp-Rezeptors (Hm2pcD bzw. Hm5pcDp1) bzw. punktmutierter Rezeptoren. In diesen Rezeptoren sind eine oder zwei Aminosäuren des M₂-Proteins gegen die jeweils korrespondierende Aminosäure des M₅-Rezeptors ausgetauscht, nämlich M₂¹⁷⁷Tyrosin gegen Glutamin und M₂⁴²³Threonin gegen Histidin. Die Durchführung einer zielgerichteten Mutagenese ausgehend vom M₂-Rezeptor war nicht notwendig, da die entsprechenden Plasmide, lokalisiert in Echerichia coli-Bakterien (E. coli), bereits vorhanden waren.

2.2.2.1 Plasmid-DNA-Gewinnung

Um eine ausreichende Menge an gewünschter Plasmid-DNA zu erhalten, wurde zunächst eine Übernachtskultur zur Vermehrung des entsprechenden Bakterienklons angesetzt. Hierzu wurden 500 ml Ampicillin-haltiges LB-Nährmedium (L4) mit einer kleinen Menge einer gefrorenen, Glycerol-haltigen Bakterienklon-Kultur („Glycerol-Stock“) angeimpft. Die Amplifikation der Bakterien erfolgte während der nachfolgenden 16 bis 18 Stunden in einem Schüttelinkubator (M13) bei 37 °C und 200 rpm.

Von Zeit zu Zeit war es erforderlich, neue Glycerol-Stocks herzustellen, um deren Bestand zu ergänzen. Dazu wurden vor der eigentlichen Plasmid-DNA-Gewinnung der Bakterienkultur einige Aliquota von 900 µl entnommen und zusammen mit 300 µl Glycerol 60 % (L6) in ein steriles Kryoröhrchen überführt, geschüttelt und anschließend zügig bei – 80 °C eingefroren.

Im Anschluss daran wurden die in den Bakterien vorliegenden Plasmide in einem mehrstufigen Prozess von unerwünschten Begleitstoffen mit Hilfe eines speziellen Kits der Firma Quiagen (M14) abgetrennt. Nachfolgend wird der theoretische Hintergrund der einzelnen Trennschritte näher erläutert, das exakte Protokoll kann dem Handbuch des Kits entnommen werden. Die meisten der verwendeten Reagenzien und Lösungen sind Bestandteile des Kits, daher findet sich nur für diejenigen, die nicht im Kit enthalten sind, ein Verweis auf die Kapitel 2.6.2 und 2.7, wo einzelne Reagenzien bzw. die Herstellung verschiedener Lösungen beschrieben werden.

Durch einen ersten Zentrifugationsschritt (M15, 30 min, 4 °C, 7000 rpm) wurden die Bakterienzellen von restlichem Nährmedium abgetrennt. Die anschließend als Pellet vorliegenden Zellen wurden in mit RNase A versetztem Tris-EDTA-Puffer (L7) resuspendiert, zusätzlich wurde Natriumhydroxid-Natriumdodecylsulfat-Puffer zugegeben, um die Zellen alkalisch zu lysieren. Während dieses Prozesses kommt es durch Zerstörung der Zellwand zur Freisetzung der Zellbestandteile, die im Anschluss unterschiedlich schnell denaturieren. Bei Proteinen und chromosomaler DNA geschieht dies recht schnell, bei Plasmid-DNA etwas langsamer. Da vorhandene RNA-Moleküle durch RNase A abgebaut werden, liegt nach etwa fünf Minu-

ten vor allem unveränderte Plasmid-DNA vor, weshalb dieser Zeitraum exakt eingehalten wurde. Der Zusatz von Kaliumacetat-Puffer beendet die alkalische Lyse und führt aufgrund der hohen Salzkonzentration zum Ausfall von Kaliumdodecylsulfat, worin die verschiedenen, denaturierten Zellbestandteile eingeschlossen sind. Besonders die kleinen Plasmid-DNA-Moleküle verblieben in Lösung und konnten durch einen weiteren Zentrifugationsschritt abgetrennt werden.

Der Überstand wurde anschließend auf eine präequilibrierte Anionenaustauscher-Säule gegeben, die positive Ladungen trägt und somit ausschließlich anionisch vorliegende Moleküle zurückzuhalten vermag. Die Plasmid-DNA wird auf diese Art gebunden, andere, ebenfalls negativ geladene Verbindungen können sich aufgrund der Salz- und pH-Bedingungen des Überstandes nicht dauerhaft an das Säulenmaterial anlagern. Mittels verschiedener Spül-Puffer werden Reste unerwünschter Begleitstoffe, inklusive die an der Plasmid-DNA anhaftenden Nucleinsäure-bindenden Proteine entfernt. Ein zuletzt zugesetzter, hochkonzentrierter Salzpuffer eluiert schließlich die gewünschte Plasmid-DNA.

Das Eluat wurde in einem Falcon-Gefäß aufgefangen. Durch Zusatz von absolutem Isopropanol (R16) wurde die Plasmid-DNA ausgefällt, um sie aufzukonzentrieren und von Bestandteilen des Puffers abzutrennen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die DNA-Pellets mit Ethanol 70 % (L8) gewaschen, um letzte Salzreste zu entfernen und das schwerer flüchtige Isopropanol zu verdrängen. Im Anschluss an einen letzten Zentrifugationsschritt wurden die Pellets kurz an der Luft getrocknet, mit 600 µl Tris-EDTA-Puffer resuspendiert, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und abschließend bei – 20 °C eingefroren.

2.2.2.2 Bestimmung von Gehalt und Reinheit der Plasmid-DNA

Nach der Gewinnung der Plasmid-DNA (siehe 2.2.2.1) wurde deren Gehalt und Reinheit im Bezug auf Protein-Beimischungen mit einem UV-Spektrometer (M16) bestimmt.

Die Gehaltsbestimmung erfolgte bei der Wellenlänge $\lambda = 260 \text{ nm}$, da dort doppelsträngiges DNA-Material ein Absorptionsmaximum aufweist. 8 µl Plasmid-DNA-Lösung wurden im Verhältnis 1:50 mit 392 µl Aqua pro analysi (R18) verdünnt und

gegen Aqua dest. als Referenz vermessen. Der Gehalt errechnete sich unter Verwendung des Messwertes der Absorption ($A_{(260)}$) anhand der folgenden Gleichung:

$$\text{Plasmid-DNA-Gehalt } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = A_{(260)} \cdot 0,05 \cdot 50 \quad (\text{Gl. 2.1})$$

Zur Bestimmung der Probenreinheit wurde eine zweite Absorptionsmessung bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ angeschlossen, da bei dieser Wellenlänge Proteinstrukturen eine starke Absorption ($A_{(280)}$) zeigen. Die Reinheit wurde auch rechnerisch ermittelt:

$$\text{Reinheit der Plasmid-DNA-Probe} = \frac{A_{(260)}}{A_{(280)}} \quad (\text{Gl. 2.2})$$

Bei Proben, die nahezu ausschließlich DNA-Material enthalten, liegt der nach Gleichung 2.2 ermittelte Reinheitswert bei etwa 1,8 bis 2,0 und nimmt mit dem Grad von Protein-Verunreinigungen zunehmend ab.

2.2.2.3 Überführung und Verwendung der genetischen Informationen

Im Rahmen eines mehrstufigen Zyklus wurde die zuvor gewonnene (siehe 2.2.2.1) Plasmid-DNA transient in sich in Kultur befindliche COS7-Zellen (siehe 2.2.2.3.2) transfiziert, anschließend wurden von den transfizierten Zellen die Plasmamembranen, welche die exprimierten Rezeptoren enthielten, isoliert. Dies stellte den Abschluss der gen- bzw. zellbiologischen Arbeiten dar und lieferte die klonierten bzw. punktmutierten Rezeptor-Proteine.

2.2.2.3.1 Vorbereitung der COS7-Zellen

Zu Beginn des Zyklus wurden die zuvor angezüchteten Zellen ausgezählt und in neue, kleine Kulturschalen verteilt. Die Zellen wurden zunächst nach der unter 2.2.1 beschriebenen Methode von altem Nährmedium befreit, gewaschen und vom

Kulturschalen-Boden abgelöst. Nach Inaktivierung des Trypsin-EDTA-Gemisches wurde die Zellsuspension in ein Falcon-Gefäß überführt und sodann für 4 min bei Raumtemperatur und 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das verbliebene Zellpellet mit frischem Nährmedium resuspendiert.

Im Anschluss wurde die Zellzahl dieser Suspension mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (M17) bestimmt. Dazu wurden nach Aufbringen des Deckgläschens 10 µl Suspension in die Kammer pipettiert, die sich bedingt durch Kapillarkräfte rasch verteilten. Unter einem Mikroskop (M18) wurden die Zellen, die sich innerhalb der 16 Quadranten der Zählkammer, was einem Suspensionsvolumen von 0,1 µl entspricht, befanden, ausgezählt.

Ein Volumen, welches etwa $1,6 \cdot 10^6$ Zellen enthält, wurde abschließend zu 7 ml frischem Nährmedium in eine kleine Kulturschale gegeben, gut geschwenkt und bis zum nächsten Tag im Brutschrank aufbewahrt.

2.2.2.3.2 Transiente Transfektion

Am zweiten Tag des Zyklus wurden die Plasmid-DNA-Moleküle transient in die vorbereiteten COS7-Zellen, deren Konfluenz idealerweise etwa 60 – 80 % betragen sollte, transfiziert. Zu diesem Zweck wurde die Methode der Lipofektion verwendet, wobei in Liposomen eingeschlossenes DNA-Material in COS7-Zellen eingeschleust wird.

In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde zunächst reines Nährmedium vorgelegt, auf den Zusatz von fötalem Kälberserum sowie Penicillin/Streptomycin wurde an dieser Stelle verzichtet, da diese die Liposomen-Bildung stören würden. Zu dieser vorgelegten Lösung wurden etwa 4 µg der gewünschten Plasmid-DNA, das dazu notwendige Volumen ergab sich aus dem zuvor bestimmten Gehalt (siehe 2.2.2.2). Es resultierte ein Gesamtvolumen aus Nährmedium und DNA-Suspension von etwa 300 µl. Dieses Gemisch wurde kurz geschüttelt und zentrifugiert, um sicherzustellen, dass sich die Plasmid-DNA im Nährmedium befand.

Im Anschluss wurden 25 µl PolyFect[®]-Transfektionsreagenz (R19) hinzugegeben und erneut geschüttelt. Es entstanden kompakte, positiv geladene, DNA-haltige Liposomen, die sich leicht an die anionischen COS7-Zellmembranen anlagerten,

was ihre anschließende Aufnahme in die Zellen in Form von Endosomen erleichterte. Im Normalfall würde Fremd-DNA, die auf diese Weise in die Zelle eindringt, sofort durch lysosomale Nucleasen abgebaut werden. Aufgrund des pH-Wertes des PolyFect[®]-Reagenzes werden diese Nucleasen inaktiviert, so dass die intakte Plasmid-DNA zum Zellkern transportiert werden konnte.

Während einer sich anschließenden, 5 – 10 minütigen Inkubationszeit wurde bei den am Vortag vorbereiteten Zellen nach dem unter 2.2.1 beschriebenen Verfahren das alte Nährmedium entfernt und durch 7 ml frisches Medium ersetzt. Danach wurde die Liposomen-Bildung aus PolyFect[®] und Plasmid-DNA durch Zugabe von 1 ml zusatzhaltigem Nährmedium beendet. Der Inhalt des Eppendorf-Reaktionsgefäßes wurde kurz durchmischt und zügig auf die Zellen gegeben. Zur gleichmäßigeren Verteilung wurde der Inhalt der Kulturschale gut geschwenkt und danach für zwei Tage in den Brutschrank gestellt.

2.2.2.3.3 Präparation der Rezeptoren-haltigen Membranen

Zwei Tage nach der Transfektion erfolgte die Herstellung von Membransuspensionen ausgehend von COS7-Zellen, die in der Zwischenzeit die gewünschten Muskarin-Rezeptoren exprimiert hatten.

Zunächst wurde bei einer Charge von zehn Kulturschalen das alte Nährmedium verworfen und der Zellrasen einer jeden Schale mit 2 ml, auf 37 °C erwärmtem PBS-Puffer vorsichtig gewaschen, ohne die anhaftenden Zellen zu entfernen. Dann wurden sie mit 4 ml eines eisgekühlten 5 mM Na-K-PO₄-Puffers (L9) versetzt und mit Hilfe eines Zellschabers (M19) vom Boden gelöst. Die einzelnen Zellsuspensionen wurden in zwei eisgekühlten Zentrifugenröhrchen gesammelt und unter Verwendung eines Polytron-Homogenisators (M20) dreimal für jeweils 10 sec zerkleinert, wobei die Zellen zerstört wurden. Das Gemisch wurde anschließend für 30 min bei 4 °C und 18000 rpm zentrifugiert, der Überstand sodann verworfen.

Die beiden Membranfragment-haltigen Pellets jeder Charge wurden in je 2 ml eisgekühltem 5 mM Na-K-PO₄-Puffer resuspendiert und in einem Potter-Elvehjem-Glashomogenisator vereinigt. Nach zweifachem Spülvorgang der Zentrifugenröhrchen zum möglichst vollständigen Erfassen der Membranen mit je 2 ml 5 mM Na-

K-PO₄-Puffer und anschließendem Überführen der Spül-Flüssigkeiten in den Glas-homogenisator erfolgte ein weiterer Homogenisierungsschritt per Hand. Die ent-standene Suspension wurde mit 5 mM Na-K-Phosphat-Puffer auf 21 ml aufgefüllt. Volumenportionen von 0,5 bzw. 1 ml wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipet-tiert und zügig bei – 80 °C bis zur experimentellen Verwendung eingefroren.

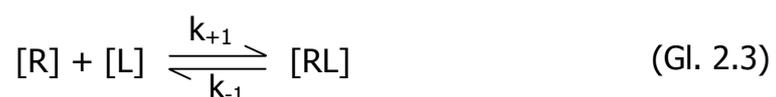
2.3 Radioligand-Bindungsstudien

Die zuvor hergestellten Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe (siehe 2.1) bzw. klonierten oder punktmultierten Muskarin-Rezeptoren (siehe 2.2) wurden im Rahmen von Radioligand-Bindungsstudien zur Charakterisierung allosterischer Testsubstanzen verwendet. Im Folgenden soll zunächst die dabei zugrunde liegende Theorie erläutert werden, daran anschließend finden sich detaillierte Beschreibungen der praktischen Durchführung.

2.3.1 Theoretische Grundlagen

2.3.1.1 Allgemeine Zusammenhänge

Die reversible Interaktion eines Liganden L mit einem Rezeptor R unter Bildung von Ligand-Rezeptor-Komplexen RL kann anhand des Massenwirkungsgesetzes beschrieben werden:



Dabei stehen [R], [L] und [RL] für die Konzentration des Rezeptors, des Liganden sowie der Ligand-Rezeptor-Komplexe und k₊₁ bzw. k₋₁ für die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziations- bzw. Dissoziationsreaktion dieser Komplexe.

Betrachtet man isoliert die Geschwindigkeit der Ligand-Assoziation an einen freien Rezeptor, so gilt:

$$v_{\text{hin}} = k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] \quad (\text{Gl. 2.4})$$

Analog gehorcht der Dissoziationsvorgang eines Ligand-Rezeptor-Komplexes dieser Gesetzmäßigkeit:

$$v_{\text{rück}} = k_{-1} \cdot [RL] \quad (\text{Gl. 2.5})$$

Definitionsgemäß befindet sich eine Reaktion im dynamischen Gleichgewicht, wenn sich innerhalb einer bestimmten Zeiteinheit die Konzentrationen der beteiligten Reaktionspartner nicht mehr ändert. Die Geschwindigkeiten der Assoziation und Dissoziation sind in diesem Fall identisch, weshalb sich aus

$$v_{\text{hin}} = v_{\text{rück}} \quad (\text{Gl. 2.6})$$

folgender Zusammenhang ergibt:

$$k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] = k_{-1} \cdot [RL] \quad (\text{Gl. 2.7})$$

Bildet man den Quotienten der beiden kinetischen Konstanten, so erhält man die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D bzw. deren reziprokes Gegenstück, die Gleichgewichts-Assoziationskonstante K_A :

$$K_D = \frac{1}{K_A} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} \quad (\text{Gl. 2.8})$$

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D trägt die Einheit [mol/l] und entspricht derjenigen Ligandkonzentration, bei welcher die Hälfte aller Rezeptoren als Ligand-Rezeptor-Komplexe vorliegen, und ist daher ein Maß für die Affinität eines Liganden zum betrachteten Rezeptor. Ein niedriger Wert für K_D ist somit gleich bedeutend mit einer hohen Rezeptor-Affinität des Liganden.

2.3.1.2 Charakterisierung der Bindungseigenschaften einer Membransuspension

2.3.1.2.1 Homologe Konkurrenzexperimente

Diese Art von Untersuchungen dient der Bestimmung typischer Kenngrößen einer Membransuspension, um dadurch deren Bindungseigenschaften zu charakterisieren. Von besonderem Interesse ist hier die in einer Suspension enthaltene Rezeptor-Konzentration B_{\max} sowie die Affinität K_D des verwendeten Liganden zu diesen Rezeptoren.

Homologe Konkurrenzexperimente zeichnen sich durch gleichzeitige Anwesenheit eines radioaktiv markierten Liganden sowie eines strukturidentischen, nicht markierten Analogons aus, die um dieselbe Bindungsstelle am Rezeptorprotein konkurrieren. Die Konzentration des Radioliganden wird stets konstant gehalten, wohingegen die des Kompetitors stufenweise erhöht wird. Dadurch wird die markierte Verbindung zunehmend gehemmt, was über eine flüssig-szintigrafische Messung der gebundenen Aktivität quantifiziert werden kann. Die Bestimmung der Gesamtbindung des Radioliganden erfolgt in Abwesenheit des nicht markierten Analogons. Die unspezifische Bindung wird unter Verwendung einer im Überschuss zugesetzten, nicht markierten, strukturverschiedenen Verbindung ermittelt, die mit dem Radioliganden um dieselbe Bindungsstelle konkurriert.

Im Rahmen der Auswertung wird die gemessene Radioaktivität der markierten Verbindung gegen die logarithmierte Konzentration des strukturidentischen Kompetitors aufgetragen, woraus ein sigmoider Kurvenverlauf resultiert, der durch die sogenannte „4-Parameter-logistische Gleichung von Barlow und Blake“ (1989) beschrieben werden kann. Das darin enthaltene Steigungsmaß entspricht dem Hill-Koeffizienten n_H der gleichnamigen, von Hill 1910 veröffentlichten Gleichung und wird daher analog als n_H ausgedrückt:

$$B_{\text{ges}} = \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 + \left(\frac{\text{EC}_{50}}{10^{[x]}} \right)^{n_H}} \quad (\text{Gl. 2.9})$$

Dabei stehen B_{ges} für die Gesamtbindung des Radioliganden, Min für die nicht ab-sättigbare Bindung in Anwesenheit hoher Konzentrationen an strukturidentischem Kompetitor (unteres grafisches Plateau), Max für die spezifische Bindung in Abwesenheit des Kompetitors (oberes grafisches Plateau), EC_{50} für den Wendepunkt der nichtlinearen Regressionskurve, $[x]$ für die Konzentration des Kompetitors und n_H für die Steilheit der sigmoiden Kurve. Ist das Steigungsmaß n_H nicht signifikant verschieden von -1 auf, darf angenommen werden, dass die Reaktion dem Massenwirkungsgesetz gehorcht und eine 1:1-Interaktion zwischen dem Radioliganden und einer einheitlichen Rezeptor-Population vorliegt.

Der Wendepunkt IC_{50} des sigmoiden Kurvenverlaufes bezeichnet diejenige Kompetitor-Konzentration, bei welcher die Anzahl der Radioligand-Rezeptor-Komplexe im Vergleich zur Gesamtbindung auf 50 % abgesenkt ist. Daher korreliert IC_{50} invers mit der Affinität des Kompetitors. Die 1973 von Cheng und Prussoff vorgestellte Gleichung kann zur Quantifizierung der Bindungs-Konstante verwendet werden, die dort als Inhibitionskonstante K_I bezeichnet wird. Die Voraussetzung der Gültigkeit dieser nachfolgenden Gleichung ist das Vorliegen eines Reaktions-Gleichgewichts:

$$K_I = \frac{\text{IC}_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \quad (\text{Gl. 2.10})$$

Dabei stehen $[L]$ für die Konzentration und K_D für die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Radioliganden (siehe 2.3.1.1).

Bei homologen Competitionsexperimenten sind die Strukturen von Radioligand und Kompetitor identisch und weisen die gleichen Affinitäten zum Rezeptor auf, weshalb auch deren Bindungs-Konstanten identisch sein müssen. Daher gilt:

$$K_I = K_D \quad (\text{Gl. 2.11})$$

Dieser Zusammenhang vereinfacht Gleichung 2.10 wie folgt:

$$K_D = IC_{50} - [L] \quad (\text{Gl. 2.12})$$

Anders ist die Situation, wenn Radioligand und Kompetitor nicht über eine identische Struktur verfügen. Die Bindungs-Konstante K_I des Kompetitors kann in diesem Fall erst nach vorangegangener Bestimmung der Bindungs-Konstante K_D des Radioliganden aus homologen Kompetitionsexperimenten errechnet werden. In einem solchen Fall spricht man von heterologen Kompetitionsexperimenten und K_I kann nach Gleichung 2.10 bestimmt werden.

Der Parameter B_{\max} , der, wie bereits erwähnt, für die Konzentration an Rezeptoren in einer Membransuspension steht, setzt sich additiv aus der Konzentration an freien Rezeptoren und Ligand-Rezeptor-Komplexen zusammen:

$$B_{\max} = [R] + [RL] \quad (\text{Gl. 2.13})$$

Eine Möglichkeit zur Bestimmung von B_{\max} veröffentlichten DeBlasi et al. 1989:

$$B_{\max} = \frac{B_0 \cdot IC_{50}}{[L]} \quad (\text{Gl. 2.14})$$

Dabei stehen B_0 für die spezifische, d.h. absättigbare Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des nicht markierten, strukturidentischen Kompetitors, IC_{50} für diejenige Kompetitor-Konzentration, bei welcher die Bindung des Radioliganden auf die Hälfte reduziert wurde und $[L]$ für die Konzentration des Radioliganden.

2.3.1.2.2 Bestimmung der fraktionellen Rezeptorbesetzung

Bei einer gegebenen Ligandkonzentration sind gewöhnlicherweise nicht alle Rezeptoren besetzt. Den Anteil der besetzten Rezeptoren gibt die fraktionelle Rezeptorbesetzung B_f wieder, sie ist neben der Ligandkonzentration $[L]$ eine Funktion der Affinität K_D des Liganden:

$$B_f = \frac{[RL]}{B_{\max}} = \frac{[L]}{[L] + [K_D]} \quad (\text{Gl. 2.15})$$

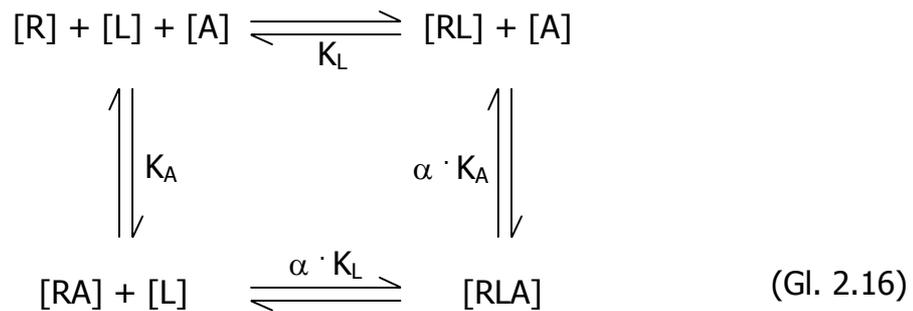
Dabei stehen $[RL]$ für die Konzentration an Ligand-Rezeptor-Komplexen und B_{\max} für die Gesamtkonzentration an Rezeptoren in der Membransuspension.

2.3.1.3 Heterologe Interaktionsexperimente

Bei dieser Art von Bindungsstudien wird der Einfluss einer Testsubstanz auf die Gleichgewichtsbindung des Radioliganden untersucht.

Die Bindung eines Liganden an seinem Haftareal kann durch eine zweite, strukturverschiedene Substanz, die an einer anderen Stelle des Rezeptorproteins bindet, beeinflusst werden. Ein solches Phänomen ist ein Sonderfall heterologer Interaktion und wird als Allosterie bezeichnet. Eine unabdingbare Voraussetzung ist die Anwesenheit von zwei verschiedenen spezifischen Bindungsstellen am Rezeptorprotein, wie sie bei allen fünf Muskarin-Rezeptor-Subtypen in Form der orthosterischen sowie der zusätzlichen allosterischen Bindungsstelle gegeben ist (siehe 1.2). Durch die Bildung binärer Komplexe bestehend aus Rezeptor und orthosterischem Liganden bzw. Rezeptor und allosterischem Modulator kann es zu einer veränderten Affinität des noch ungebundenen Reaktionspartners an seiner Bindungsstelle kommen. Dadurch wird die Entstehung von ternären Komplexen erschwert, erleichtert oder sie bleibt mit unveränderter Wahrscheinlichkeit bestehen. Diese gegenseitige Beeinflussung von Orthoster und Alloster wird als negative, positive bzw. neutrale Kooperativität bezeichnet und mathematisch durch den Faktor „ α “ ausgedrückt. Bei negativer Kooperativität ist α größer 1, bei positiver kleiner 1 und bei neutraler Kooperativität ist α gleich 1.

Die mathematischen Zusammenhänge lassen sich auf das von Stockton et al. (1983) formulierte und von Ehlert (1988) aufgegriffene ternäre Modell allosterischer Interaktion zurückführen:



Dabei stehen [R], [L] und [A] für die Konzentrationen der freien Rezeptoren, des Liganden und des Allosters, [RL], [RA] und [RLA] für die Konzentrationen an binären und ternären Komplexen, α für den Kooperativitätsfaktor und K_L bzw. K_A für die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten der Bindung des orthosterischen Liganden bzw. allosterischen Modulators (K_A aus diesem Zusammenhang ist nicht zu verwechseln mit der Gleichgewichts-Assoziationskonstante K_A aus Gleichung 2.8). Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_L und K_A spiegeln die Affinität des orthosterischen bzw. allosterischen Liganden zu freien Rezeptoren wieder. K_A kann in einem Bindungsexperiment durch Einsatz eines radioaktiv markierten Orthosters in fixer Konzentration sowie eines nicht markierten Allosters, welcher in steigender Konzentration zugesetzt wird, bestimmt werden. Die Analyse einer Darstellung der gemessenen Orthoster-Bindung gegen die logarithmierte Alloster-Konzentration kann mit Hilfe einer Gleichung durchgeführt werden, die aus dem ternären Modell abgeleitet wurde:

$$B_A = B_0 \cdot \frac{[L] + K_L}{[L] + K_L \cdot \frac{K_A + [A]}{K_A + \frac{[A]}{\alpha}}} \quad (\text{Gl. 2.17})$$

Dabei stehen B_A bzw. B_0 für die spezifische Bindung des Radioliganden L in Anwesenheit bzw. Abwesenheit des allosterischen Modulators A. Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_L kann im Rahmen homologer Konkurrenzexperimente ermittelt werden, wo sie als K_D bezeichnet wird (siehe 2.3.1.2.1). Mit dieser Gleichung ist die Bestimmung des Einflusses allosterischer Modulatoren auf die

Gleichgewichtsbindung orthosterischer Liganden möglich, was ein zentrales Element dieser Arbeit darstellt.

Bei neutraler Kooperativität ändert sich die Gleichgewichtsbindung des Orthosters in Anwesenheit eines allosterischen Modulators nicht, eine Quantifizierung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_A anhand der nicht linearen Regressionsanalyse 2.17 ist daher nicht möglich. Um auch Ergebnisse dieser Art analysieren zu können, wird unter Voraussetzung der Gültigkeit des Kooperativitätsmodells in einem solchen Fall K_A durch den Quotienten $EC_{0,5diss}/\alpha$ berechnet (Daiss et al., 2002). $EC_{0,5diss}$ wird in kinetischen Experimenten ermittelt (siehe 2.3.1.4) und steht für diejenige Konzentration des Modulators, bei der die Dissoziationsgeschwindigkeit eines orthosterischen Liganden halbmaximal reduziert wird.

Die Anwendbarkeit von Gleichung 2.16 und dadurch auch der abgeleiteten Gleichung 2.17 zur Analyse allosterischer Interaktionsexperimente ist nur gegeben, wenn die Reaktion zum Zeitpunkt der Messung ein dynamisches Gleichgewicht erreicht hat. Zur Abschätzung der dafür erforderlichen Zeit t_x kann eine von Lazareno und Birdsall (1995) angegebene Gleichung verwendet werden:

$$t_x = 5 \cdot t_{1/2obs} = 5 \cdot t_{1/2off} \cdot \left(1 + [A] \cdot \frac{1}{EC_{0,5diss}} \right) \quad (\text{Gl. 2.18})$$

Dabei stehen $t_{1/2obs}$ für die Halbwertszeit zur Einstellung der Gleichgewichtsbindung des Radioliganden, $t_{1/2off}$ für die Halbwertszeit der Dissoziation des orthosterischen Liganden in Abwesenheit eines allosterischen Modulators, $[A]$ für die Konzentration des Modulators und $EC_{0,5diss}$ für diejenige Modulator-Konzentration, die zu einer halbmaximalen Dissoziationsverzögerung des Orthosters vom Rezeptor führt (siehe 2.3.2.4).

Die Zeit, die bis zur Einstellung des Bindungsgleichgewichtes verstreicht, ist strenggenommen unendlich. Der Anteil des Gleichgewichtes $Gl_{\%}$ in [%], der nach Durchlaufen einer bestimmten Anzahl n von Halbwertszeiten bereits erreicht ist, ergibt sich aus der folgenden Gleichung:

$$Gl_{\%} = \sum_{i=1}^n \frac{100}{2^i} \quad (\text{Gl. 2.19})$$

Für die durchgeführten Versuche wurde eine Inkubationszeit von fünf Halbwertszeiten gewählt, das Gleichgewicht ist danach zu etwa 97 % erreicht.

2.3.1.4 Kinetische Experimente

Im Unterschied zu den zuvor beschriebenen Untersuchungstechniken wird bei kinetischen Experimenten die Abhängigkeit eines Prozesses von der Zeit und daher unter Ungleichgewichtsbedingungen betrachtet. Die im Zuge der vorliegenden Arbeit durchgeführten Bindungsstudien dieser Art untersuchen die Abhängigkeit des Zerfalls von Ligand-Rezeptor-Komplexen von der Einwirkung unterschiedlicher Konzentrationen allosterischer Testsubstanzen.

Allosterische Modulatoren sind an muskarinergen Rezeptoren in der Lage, sowohl die Ligand-Assoziation als auch deren Dissoziation zu verzögern (siehe 1.2). Während eine verlangsamte Ligand-Assoziation auch unter Einwirkung eines Kompetitors beobachtet werden kann, stellt eine veränderte Geschwindigkeit der Ligand-Dissoziation ein ausschließlich auf die allosterische Modulation beschränktes Phänomen dar (Kostenis und Mohr, 1996a). Eine Verbindung, die den Zerfall von Ligand-Rezeptor-Komplexen verzögert, muss zwangsläufig über ein anderes Haftareal als das Orthoster verfügen. Aus diesem Grund ist das Vorliegen eines verlangsamten Dissoziationsprozesses ein eindeutiger Beweis für die Ausbildung ternärer Komplexe und somit für die allosterische Wirksamkeit einer Testsubstanz.

Das Auftreten einer Dissoziationsverzögerung kann als Entscheidungshilfe in zwei anderen Situationen herangezogen werden. Im Rahmen heterologer Interaktionsexperimente (siehe 2.3.1.3) ist das Auftreten einer starken Bindungsabsenkung des Radioliganden bei höherer Testsubstanzkonzentration bedingt durch zwei unterschiedliche Prinzipien denkbar. Der Reaktionspartner könnte ein stark negativ kooperativer allosterischer Modulator oder ein kompetitiv wirkender Ligand sein (Christopoulos und Kenakin, 2002). Falls die Substanz im kinetischen Experiment eine Dissoziationsverzögerung zeigt, wäre dies ein Fingerzeig für ein allosterisches und gegen ein orthosterisches Bindungsverhalten. Darüber hinaus ist auch das Auftreten neutraler Kooperativität, also das Verharren der Orthoster-Gleichgewichtsbindung trotz Alloster-Zugabe auf konstanten Niveau, zunächst nicht ein-

deutig als solche erkennbar, da auch das Fehlen jeglicher Interaktion zwischen einer Testsubstanz und dem Ligand-Rezeptor-Komplex vorliegen könnte. Für den zuletzt skizzierten Fall wäre die Testsubstanz jedoch nicht in der Lage, die Ligand-Dissoziation zu beeinflussen und würde somit über keine allosterische Potenz verfügen (Kostenis und Mohr, 1996b; Daiss et al., 2002; Duda-Johner, 2002).

Durch die Untersuchung des Einflusses eines Modulators auf den Zerfall von Ligand-Rezeptor-Komplexen lässt sich die Affinität desselbigen zu Orthoster-besetzten Rezeptoren ermitteln. Als Maß für die Affinität wird der Parameter „ $EC_{0,5diss}$ “ verwendet. Er ist der Wendepunkt der aus der Analyse entstandenen sigmoiden Konzentrations-Effekt-Kurve und steht für diejenige Modulator-Konzentration, mit welcher die Dissoziationsgeschwindigkeit des Radioliganden halbmaximal verzögert wird. Bei dieser Konzentration ist die Hälfte der Ligand-Rezeptor-Komplexe zusätzlich allosterisch besetzt, sie liegen also als ternäre Komplexe vor (Tränkle et al., 1998; siehe 2.3.1.3). Ist der Modulator in hohen Konzentrationen in der Lage, die Orthoster-Dissoziation komplett zu unterdrücken, so liegt der Wendepunkt der Konzentrations-Effekt-Kurve bei halbmaximaler Verzögerung bei exakt 50 % des Ausgangswertes in Abwesenheit des Modulators und kann als „ EC_{50diss} “ bezeichnet werden.

Bei Bindungsuntersuchungen, die sich im Ungleichgewicht befinden, ändert sich die pro Zeiteinheit dt gebildete Anzahl $d[RL]$ an Ligand-Rezeptor-Komplexen in Abhängigkeit zweier gegenläufiger Prozesse, der Assoziation sowie der Dissoziation (siehe 2.3.1.1):

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] - k_{-1} \cdot [RL] \quad (\text{Gl. 2.20})$$

Um den Dissoziationsvorgang isoliert betrachten zu können, wird ein nicht markierter, ebenfalls orthosterisch bindender Kompetitor im Überschuss zugesetzt, der nach erfolgter Dissoziation eine Reassoziaton des Liganden nahezu vollständig verhindert. In diesem Fall ist die Geschwindigkeit der Assoziation vernachlässigbar gering und Gleichung 2.20 vereinfacht sich zu:

$$\frac{d[\text{RL}]}{dt} = -k_{-1} \cdot [\text{RL}] \quad (\text{Gl. 2.21})$$

Der verbliebene Dissoziationsprozess lässt sich durch eine monoexponentielle Funktion beschreiben:

$$[\text{RL}]_t = [\text{RL}]_0 \cdot e^{-k_{-1} \cdot t} + u \quad (\text{Gl. 2.22})$$

Dabei stehen $[\text{RL}]_t$ für die Gesamtbindung des Liganden zum Zeitpunkt t , $[\text{RL}]_0$ für die spezifische Bindung des Liganden zum Zeitpunkt $t = 0$ unmittelbar vor Beginn der Dissoziationsmessung, k_{-1} für die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation des Orthosters vom Rezeptor und u für die unspezifische Bindung des Liganden.

Wenn k_{-1} in Anwesenheit eines Modulators bestimmt wird, trägt sie auch die Bezeichnung „apparente Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation“. Sie steht in inversem Verhältnis zur Halbwertszeit $t_{1/2}$, die denjenigen Zeitraum beschreibt, in welchem die Anzahl anfänglich vorhandener Ligand-Rezeptor-Komplexe auf die Hälfte abgesunken ist:

$$k_{-1} = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \quad (\text{Gl. 2.23})$$

Ein zugesetzter allosterischer Modulator beeinflusst die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation k_{-1} und somit aufgrund von Gleichung 2.23 auch die Halbwertszeit $t_{1/2}$ in konzentrationsabhängiger Art und Weise. Dies wird bei der Analyse des kinetischen Experimentes ausgenutzt, indem der Zahlenwert von k_{-1} bei einer bestimmten Modulator-Konzentration im Verhältnis zu seinem Wert in Abwesenheit des Modulators (Kontrollbedingungen) auf der Ordinate gegen die logarithmierte Konzentration des Modulators auf der Abszisse aufgetragen wird. Es resultiert eine sigmoide, auf Gleichung 2.9 basierende Konzentrations-Effekt-Kurve, deren Wendepunkt, wie bereits erwähnt, dem $\text{EC}_{0,5\text{diss}}$ -Wert entspricht. Eine Kurvensteilheit, ausgedrückt durch den Hill-Koeffizienten n_H , die sich signifikant von -1 unterscheidet, ist dabei ein Hinweis auf ein komplexes Bindungsverhalten, beispielsweise

se bedingt durch eine uneinheitliche Rezeptor-Population oder eine nicht dem Verhältnis 1:1 entsprechende Interaktion zwischen Alloster und ligandbesetztem Rezeptor (Barlow und Blake, 1989). Das Auftreten eines von 0 % signifikant differierenden unteren Kurvenplateaus Min kann ebenfalls als ein Zeichen für ein komplexes Bindungsverhalten gedeutet werden (Gnagey et al., 1999). Ein Modulator ist hierbei nicht in der Lage, die Dissoziation eines Orthosters vollständig zu unterbinden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene kinetische Untersuchungstechniken verwendet, die nachfolgend genauer betrachtet werden. Das Augenmerk wird dabei auf diejenigen Merkmale gelegt, die beide Methoden voneinander unterscheidet.

2.3.1.4.1 Aufnahme kompletter Dissoziationsverläufe

Zur Aufnahme kompletter Dissoziationsverläufe wurde zu insgesamt 16 verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe des die Reassoziation unterdrückenden Kompetitors eine Messprobe entnommen und die Menge an gebundenem Radioligand bestimmt. Dies erlaubt aufgrund der hohen Dichte an Messpunkten eine sehr präzise Bestimmung des Dissoziationsverlaufes und damit auch eine Erfassung nicht monophasischer Vorgänge. Von Nachteil ist bei dieser Technik allerdings der hohe experimentelle Aufwand, wenn die Monophasizität des Dissoziationsverlaufes bereits bekannt ist.

2.3.1.4.2 Zweipunkt-Dissoziationsexperimente

Bei dieser alternativen Vorgehensweise wird der Kurvenverlauf anhand von zwei Messpunkten konstruiert (Kostenis und Mohr, 1996a). Eine unerlässliche Voraussetzung zur Anwendbarkeit dieses Verfahrens ist die Monophasizität des Zerfalls der anfänglich vorliegenden Radioligand-Rezeptor-Komplexe. Unmittelbar vor der Zugabe des Kompetitors, zum Zeitpunkt $t = 0$, wird mit einer ersten Messprobe die gebundene Radioligand-Menge in Abwesenheit eines Modulators bestimmt. Zu

einem zuvor festgelegten zweiten Zeitpunkt nach Beginn der Beobachtung der Dissoziation wird das Ausmaß der noch verbliebenen Ligandbindung gemessen.

Die Wahl dieses zweiten Messzeitpunktes muss mit Bedacht geschehen, um die Effekte unterschiedlicher Modulator-Konzentrationen gut differenzieren zu können. Idealerweise sollte die Messung zu einem Zeitpunkt stattfinden, an dem die monoexponentielle Dissoziations-Kurve den steilen Anfangsteil verlassen, die untere Plateauphase aber noch nicht erreicht hat. Dies ist stark von der Radioligand-Dissoziations-Kinetik des eingesetzten Rezeptors abhängig, was innerhalb dieser Arbeit bei Studien an klonierten bzw. punktmutierten Rezeptoren zu berücksichtigen war. Als gute Näherung zur Bestimmung des optimalen Zeitpunktes hat sich die Multiplikation der Halbwertszeit der [³H]NMS-Dissoziation unter Kontrollbedingungen am betreffenden Rezeptor mit dem Faktor 1,75 herausgestellt. Die Halbwertszeiten waren bekannt, so dass die jeweiligen Dissoziationsmesszeiten berechnet werden konnten. Sie sind in Tabelle 2.8 (S. 32) angegeben.

Die Auswertung beider Messdaten mittels monoexponentieller Kurvenanalyse ergibt die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation k_{-1} . Sie kann durch die nachfolgende Gleichung bestimmt werden:

$$k_{-1} = \frac{\ln\left(\frac{B_{t,\text{spez}}}{B_{0,\text{spez}}}\right)}{t} \quad (\text{Gl. 2.24})$$

Dabei stehen $B_{t,\text{spez}}$ und $B_{0,\text{spez}}$ für die spezifische Ligandbindung zum Zeitpunkt t des zweiten Messpunktes bzw. zum Zeitpunkt $t = 0$.

Von Vorteil ist bei dieser Technik der geringe Materialeinsatz sowie der kurze Untersuchungszeitraum. Bedingt durch die lediglich auf zwei Messdaten beruhende Bestimmung von k_{-1} muss allerdings mit einer größeren Ungenauigkeit des resultierenden $EC_{0,5\text{diss}}$ -Wertes gerechnet werden, was ein Nachteil sein kann.

2.3.2 Durchführung der Untersuchungen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Radioligand-Bindungsstudien lassen sich, entsprechend der Herkunft des verwendeten Rezeptor-Materials, in zwei se-

parate Gruppen unterteilen, wobei zwischen Studien unter Verwendung von Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe (siehe 2.1) und solchen ausgehend von COS7-Zellen (siehe 2.2) zu differenzieren ist. Da zwischen diesen Gruppen in der Praxis zum Teil deutliche Unterschiede bestehen, sollen die Charakteristika der praktischen Durchführung getrennt erläutert werden.

2.3.2.1 Untersuchungen unter Einsatz von Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe

Im überwiegenden Teil der Bindungsstudien kam der radioaktiv markierte Muskarin-Rezeptor-Antagonist [^3H]N-Methylscopolamin (kurz [^3H]NMS, R23) in der Konzentration von 0,2 nM zum Einsatz, bei einigen Untersuchungen wurde alternativ 1 nM des Agonisten [^3H]Oxotremorin-M (kurz [^3H]OxoM, R24) verwendet. Zur Konstanthaltung der Reaktionsbedingungen wurde in einem Puffersystem (Mg-Phosphat-Tris-Puffer, L11) bei pH 7,3 und 37 °C gearbeitet. Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte durch eine Überschuss-Zugabe des Antagonisten Atropin (R26) in einer Endkonzentration von 1 μM . Der Kompetitor verhinderte die spezifische Bindung der Radioligand-Moleküle an das orthosterische Haftareal, weshalb sie sich nur noch unspezifisch an andere Membranstrukturen oder die Filtermaterialien anlagern konnten.

Gemäß einem für den jeweiligen Versuchstyp ausgearbeiteten Protokoll wurden die Versuchskomponenten in ein geeignetes Gefäß überführt, wobei für kinetische Untersuchungen Erlenmeyer-Kolben (M21) und für die übrigen Studien Eppendorf-Reaktionsgefäße verwendet wurden. Um Adsorptionseffekte der Modulatoren an die im Vergleich zum enthaltenen Volumen große Gefäß-Oberfläche zu verhindern, wurde die Innenseite der Reaktionsgefäße zuvor mit Sigmacote[®] (R27) silanisiert. Die befüllten Gefäße wurden nach kurzem Schütteln (M22) in ein Schüttel-Wasserbad bei 37 °C (M23) gestellt. Die in 1 ml enthaltene membrangebundene Radioaktivität wurde dann nach einem vorher festgesetzten Zeitpunkt mittels Vakuumfiltration durch Glasfaserrundfilter (M24) vom übrigen Reaktionsgemisch abgetrennt. Der Filter wurde nach zweifachem Spülen mit je 5 ml eisgekühltem Aqua dest. in ein Polyethylengefäß (M25) überführt und mit 5 ml eines Szintillations-

cocktails (R28) versetzt. Nach einer mindestens einstündigen Einwirkzeit erfolgte mit einem Flüssig-Szintillationszähler (M26) die Quantifizierung der Radioaktivität. Die abschließende Auswertung der Messdaten erfolgte in Abhängigkeit der Art des Bindungsexperimentes; nähere Angaben dazu finden sich in den folgenden Kapiteln.

2.3.2.1.1 Homologe Konkurrenzexperimente

Gemäß dem nachfolgenden Schema wurden insgesamt dreißig Eppendorf-Reaktionsgefäße befüllt, wobei jeder einzelne der zehn bzw. acht verschiedenen Versuchsansätze – je ein Ansatz zur Messung von Gesamt- und unspezifischer Bindung sowie acht bzw. sechs Ansätze (s. u.) mit verschiedenen Konzentrationen des Kompetitors – zur präziseren Bestimmung der Radioligand-Bindung dreifach vorbereitet wurde:

Volumen [µl]	Art der Lösung	Endkonzentration im Versuchsansatz
100	[³ H]NMS in Aqua dest. oder	0,2 nM
	[³ H]OxoM in Aqua dest.	1 nM
50	Aqua dest. (Gesamtbindung) oder	1 µM
	30 µM Atropin in Aqua dest. (unspezifische Bindung) oder	
1100	nicht markiertes NMS in Aqua dest. (homologes Konkurrenzexperiment)	1/30 der einpipettierten Konzentration (siehe Angaben im Text)
	Inkubationspuffer (L11)	3 mM Mg ²⁺ , 50 mM Tris-HCl
250	Membransuspension in 50 mM Tris-HCl-Puffer	siehe Angaben im Text

Tabelle 2.2: Pipettierschema zur Durchführung homologer Konkurrenzexperimente mit Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe.

Um die Auswertung der Radioligand-Bindungsstudien gemäß der vorgestellten theoretischen Zusammenhänge durchführen zu können (siehe 2.3.1.2), ist es erforderlich, dass maximal 10 % der eingesetzten Radioligand-Menge durch die Rezeptorproteine gebunden werden, damit die freie Ligandkonzentration während des Versuches als konstant angesehen werden kann (Bennett und Yamamura, 1985). Bei der Wahl der eingesetzten Konzentration an Membransuspension war dieser Umstand zu berücksichtigen.

Die Endkonzentration des Radioliganden im Versuchsansatz lag bei 0,2 nM für [³H]NMS bzw. 1 nM für [³H]OxoM. Der betreffende, nicht radioaktiv markierte, strukturidentische Kompetitor wurde in aufsteigenden Konzentrationen eingesetzt, die Endkonzentrationen im Reaktionsansatz betragen 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 100 und 1000 nM für NMS (R29) bzw. 0,1, 1, 3, 10, 100 und 1000 nM für OxoM (R30). Die Inkubationszeit betrug in [³H]NMS/NMS- sowie [³H]OxoM/OxoM-Versuchen gleichermaßen zwei Stunden, die sich anschließende Probenaufbereitung erfolgte wie unter 2.3.2.1 beschrieben und die Auswertung lieferte die unter 2.3.1.2.1 erläuterten Kenngrößen.

2.3.2.1.2 Heterologe Interaktionsexperimente

Die praktische Durchführung dieser Untersuchungen entsprach nahezu vollständig derjenigen der homologen Kompetitionsexperimente (siehe 2.3.2.1.1). Anstatt der zunehmenden Konzentration an nicht markiertem Kompetitor wurden diesmal jedoch verschiedene Mengen an allosterischer Testsubstanz eingesetzt, um deren Einfluss auf die Radioligand-Gleichgewichtsbindung untersuchen zu können.

Zu Beginn der Arbeit wurden sämtliche heterologen Interaktionsstudien unter Verwendung des Radioliganden [³H]NMS durchgeführt, der in fixer Konzentration von 0,2 nM zum Einsatz kam. Es wurde erneut in einem Mg-Phosphat-Tris-Puffer (L11) bei 37 °C gearbeitet und auch die übrigen experimentellen Details zur Ansetzung, Filtration sowie zur abschließenden Aufbereitung der Proben können der in 2.3.2.1 skizzierten Methodik entnommen werden.

Die erforderliche Inkubationszeit ist bei dieser Art von Bindungsstudien nicht konstant. Sie ergibt sich ausgehend von der in kinetischen Untersuchungen bestimm-

ten Affinität des Modulators zu [^3H]NMS-besetzten Rezeptoren (siehe 2.3.1.4 bzw. 2.3.2.1.3) in Abhängigkeit der höchsten hier eingesetzten Modulator-Konzentration und kann nach Gleichung 2.18 errechnet werden.

Im Laufe der Arbeit stellte sich heraus, dass mit der bisherigen Versuchsmethodik eine präzise Bestimmung von K_A und α bei stark bindungsfördernden Modulatoren kaum möglich war. In diesen Fällen wurde der Radioligand gewechselt und [^3H]OxoM kam in der Endkonzentration von 1 nM zu Einsatz. Die Grundlage für einen solchen Radioligand-Wechsel findet sich in der Arbeit von M. Großmüller (2003). Demnach ist die Affinität Silizium-haltiger allosterischer Modulatoren zu freien M_2 -Rezeptoren vom eingesetzten Radioliganden unabhängig, so dass K_A auch durch den Einsatz von [^3H]OxoM ermittelt werden kann.

Das Pipettierschema änderte sich durch den Wechsel des Radioliganden nicht:

Volumen [μl]	Art der Lösung	Endkonzentration im Versuchsansatz
100	[^3H]MNS in Aqua dest.	0,2 nM
	oder [^3H]OxoM in Aqua dest.	1 nM
50	Aqua dest. (Gesamtbindung)	1 μM
	oder 30 μM Atropin in Aqua dest. (unspezifische Bindung)	
	oder allosterischer Modulator in Aqua dest. (heterologes Interaktionsexperiment)	
1100	Inkubationspuffer (L11)	3 mM Mg^{2+} , 50 mM Tris-HCl
250	Membransuspension in 50 mM Tris-HCl-Puffer	siehe 2.3.2.1.1

Tabelle 2.3: Pipettierschema zur Durchführung heterologer Interaktionsexperimente mit Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe.

Der auch von M. Großmüller untersuchte Silizium-haltige Modulator TD2 war selbst unter Einsatz hoher Konzentrationen nicht in der Lage, die [³H]OxoM-Dissoziation zu verzögern. Darüber hinaus hoben alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Silizium-haltigen Verbindungen, die in hohen Konzentrationen zum Einsatz kamen, die [³H]OxoM-Gleichgewichtsbindung komplett auf. Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass es nicht zur Ausbildung ternärer Komplexe kommt, weshalb die Bestimmung von α auf dem bekannten Weg nicht möglich ist. Es wurde daher alternativ rechnerisch verfahren, wobei zur Verdeutlichung des inhaltlichen Unterschiedes die Bezeichnung „Selektivitätsfaktor β “ statt „Kooperativitätsfaktor α “ gewählt wird:

$$\beta = \frac{EC_{0,5\text{diss}/\text{NMS}}}{K_{A/\text{OxoM}}} \quad (\text{Gl. 2.25})$$

Dabei stehen $EC_{0,5\text{diss}/\text{NMS}}$ für die in kinetischen Experimenten bestimmte Affinität der Testsubstanz zu [³H]MNS-besetzten Rezeptoren und $K_{A/\text{OxoM}}$ für die in heterologen Interaktionsstudien mit [³H]OxoM ermittelte Modulator-Affinität zu freien Rezeptoren.

Der Einsatz von [³H]OxoM hat den Nachteil, dass die unspezifische Bindung im Vergleich zur Gesamtbindung recht hoch ist. Sie konnte jedoch abgesenkt werden, indem die während der Filtration benötigten Rundfilter vor ihrer Verwendung für mindestens zwölf Stunden in 0,25 %ige Polyethylenimin-Lösung (L12) eingelegt und nach Platzieren auf die Hand-Filtrationsanlagen mit 5 ml Aqua dest. gewaschen wurden. Weiterhin wurde nach erfolgter Filtration die abgetrennte rezeptor-gebundene Aktivität dreimal mit 5 ml eisgekühltem Mg-Phosphat-Tris-Spülpuffer (L13) gewaschen. Die übrige Versuchsmethodik blieb trotz des Radioligand-Wechsels unverändert.

2.3.2.1.3 Kinetische Experimente

Im Verlauf dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener allosterischer Modulatoren auf die Dissoziation des Radioliganden [³H]NMS untersucht, wobei überwiegend komplette Dissoziationsverläufe an Membransuspensionen aus Hausschwein-

Herzventrikel-Gewebe unter Verwendung eines Mg-Phosphat-Tris-Puffers (L11) bei 37 °C über zwei Stunden verfolgt wurden.

Zunächst wurden zur Herstellung eines Vorinkubations-Gemisches verschiedene Lösungen in einen kleinen Erlenmeyer-Kolben einpipettiert:

Volumen [µl]	Art der Lösung	Endkonzentration im Versuchsansatz
1600	[³ H]NMS in Aqua dest.	0,2 nM
200	Aqua dest.	
16800	Inkubationspuffer (L11)	3 mM Mg ²⁺ , 50 mM Tris-HCl
4000	Membransuspension in 50 mM Tris-HCl-Puffer	

Tabelle 2.4: Pipettierschema für die Vorinkubations-Gemische zur Verfolgung kompletter Dissoziationsverläufe mit Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe.

Dieser Ansatz wurde zunächst für dreißig Minuten in ein Wasserbad gestellt und währenddessen mit Hilfe eines Magnetrührers (M27) durchmischt, so dass sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Ligand, Rezeptoren sowie dem Komplex aus beiden einstellen konnte. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurde für jeden Ansatz die Gesamtzahl an Ligand-Rezeptor-Komplexen durch Entnahme und anschließende Filtration von drei Proben mit je 1 ml Volumen bestimmt. Diese stellen bei der späteren Auswertung die [³H]NMS-Gesamtbindung zum Zeitpunkt $t = 0$ dar.

Unmittelbar im Anschluss begann durch Zugabe von 1400 µl der Start-Lösung die Beobachtung des Dissoziationsverlaufes, wobei Tabelle 2.5 die Zusammensetzung dieser Lösung angibt.

Volumen [µl]	Art der Lösung	Endkonzentration im Versuchsansatz
800	Aqua dest. (Kontrollexperiment)	1/30 der einpipettierten Konzentration
	oder allosterischer Modulator in Aqua dest.	
800	30 µM Atropin	1 µM

Tabelle 2.5: Pipettierschema für die Start-Lösung zur Verfolgung kompletter Dissoziationsverläufe mit Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe.

Wie unter 2.3.1.4 skizziert, ermöglichte der große Überschuss des zugegebenen Kompetitors Atropin die alleinige Betrachtung der Dissoziation durch komplette Unterdrückung von Reassoziationsprozessen.

Im Verlauf der folgenden zwei Stunden wurden aus dem Versuchsansatz anhand eines Zeitplans insgesamt zwanzig Messproben von je 1 ml entnommen und abfiltriert, so dass der Dissoziationsverlauf durch die Messpunkte gut beschrieben werden konnte. Die Weiterbehandlung der Proben erfolgte anhand dem in 2.3.2.1 beschriebenen Verfahren, die Bestimmung von $EC_{0,5diss}$ schließlich wurde basierend auf der sigmoiden Konzentrations-Effekt-Kurve vorgenommen, dies wurde in 2.3.1.4 erläutert. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass die drei Proben der Gesamtbindung mit dem Faktor 0,934 zu multiplizieren sind, um der Veränderung der Volumina sowie der Konzentrationen des Vorinkubations-Gemisches durch die Zugabe der Start-Lösung Rechnung zu tragen.

2.3.2.2 Untersuchungen unter Einsatz von Membransuspensionen aus COS7-Zellen

Ein kleinerer Teil der kinetischen Experimente dieser Arbeit wurde unter Verwendung von Muskarin-Rezeptoren durchgeführt, die von COS7-Zellen exprimiert wurden; der Dissoziationsverlauf wurde dabei anhand von zwei Punkten ermittelt. Ein Einsatz dieser Art von Membransuspension im Rahmen von heterologen Interaktionsexperimenten erfolgte nicht.

Die Bindungs-Untersuchungen wurden unter Einsatz des Radioliganden [3H]NMS durchgeführt, dessen Endkonzentration im Versuchsansatz 1 nM betrug. Es wurde bei 23 °C und mit einem auf pH 7,4 eingestellten Na-K-Phosphat-Inkubationspuffer (L14) gearbeitet. Um die Dissoziationskinetik isoliert betrachten zu können, wurde ein Atropin-Überschuss eingesetzt; die Endkonzentration dieser Komponente im Versuchsansatz betrug 3 μ M.

Die Tabelle 2.6 aufgeführten Lösungen wurden zunächst in ein Polyethylen-Gefäß eingebracht und für dreißig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich ein Gleichgewicht einstellen konnte:

Volumen [µl]	Art der Lösung	Endkonzentration im Versuchsansatz
220	[³ H]MNS in Aqua dest.	1 nM
1980	Inkubationspuffer (L14)	1 mM KH ₂ PO ₄ , 4 mM Na ₂ HPO ₄
2200	Membransuspension in 5 mM Na-K-Phosphat-Puffer	

Tabelle 2.6: Pipettierschema für das Inkubations-Gemisch im Rahmen Zweipunkt-kinetischer Experimente mit Membransuspensionen aus COS7-Zellen.

Parallel zur Inkubation wurden in einer Mikrotiterplatte (M28) die einzelnen Reaktionsansätze vorbereitet. In separaten Bohrungen wurden für jeden zu untersuchenden Modulator acht verschiedene, die Konzentrations-Effekt-Kurve möglichst gut beschreibende Konzentrationen jeweils zweifach vorgelegt, hinzu kamen vier weitere Kontrollansätze mit Aqua dest. zur Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeit in Abwesenheit des Modulators. Alle verwendeten Bohrungen wurden zusätzlich mit einer Atropin-Lösung befüllt. Die nachfolgende Tabelle 2.7 gibt Auskunft über die dabei eingesetzten Konzentrationen und Volumina:

Volumen [µl]	Art der Lösung	Endkonzentration im Versuchsansatz
100	Aqua dest. (Kontrollexperiment) oder allosterischer Modulator in Aqua dest.	1/4 der einpipettierten Konzentration
100	12 µM Atropin in 10 mM Na-K-Phosphat-Puffer	3 µM

Tabelle 2.7: Pipettierschema zur Vorbereitung der Versuchsansätze im Rahmen Zweipunkt-kinetischer Experimente mit Membransuspensionen aus COS7-Zellen.

Die Dissoziationsmessung begann durch Zugabe des Inkubations-Gemisches in die vorbereiteten Bohrungen, wobei zu jedem Versuchsansatz ein Volumen von 200 µl einpipettiert wurde. Der Rest des Gemisches, ein Sicherheitszuschlag, wurde verworfen. Die Beendigung der Reaktion erfolgte nach einer zuvor definierten Zeitspanne mittels Vakuum-Filtration des Ansatzes durch eine Filtermatte (M29) unter

Verwendung eines Tomtec-Harvesters (M30). Zur Reduzierung der unspezifischen Bindung wurde die Filtermatte vor ihrer Verwendung für etwa eine Stunde in 0,1 %ige Polyethylenimin-Lösung (L15) eingelegt. Nach der Filtration und anschließender dreimaliger Spülung mit gekühltem Aqua dest. wurde die Filtermatte getrocknet und mit einer dünnen, ein Szintillatormaterial enthaltene Wachsfolie (M31) belegt, die mit Hilfe einer Heizplatte (M32) auf den Filter geschmolzen wurde. Dieses Szintillatormaterial wandelte die gebundene Radioaktivität in Lichtblitze um, was anschließend von einem Szintillationszähler (M33) quantifiziert wurde. Die Auswertung der Messdaten erfolgte anhand der in 2.3.1.4 bzw. 2.3.1.4.2 erläuterten Vorgehensweise. Die resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven lieferten schließlich den $EC_{0,5diss}$ -Wert.

Wie bereits in 2.3.1.4.2 erläutert, weist der optimale Filtrationszeitpunkt eine starke Abhängigkeit von der Radioligand-Dissoziations-Charakteristik des eingesetzten Rezeptors auf und entspricht in etwa dem 1,75fachen der Halbwertszeit der [3H]NMS-Dissoziation in Abwesenheit eines Modulators (Kontrollbedingungen). Die Halbwertszeiten aller fünf im Zuge dieser Arbeit eingesetzten Rezeptor-Arten finden sich in der Arbeit von A. Raasch, so dass, basierend auf diesen Angaben, die direkte Berechnung der erforderlichen Dissoziationszeiten möglich war. Sie sind in Tabelle 2.8 aufgeführt.

Rezeptor-Art	Dissoziationshalbwertszeit unter Kontrollbedingungen [min]	Berechnete Dissoziationsmesszeit [min]
M ₂ -Wildtyp	5,1	9
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr -> Gln	5,9	10
M ₂ ⁴²³ Thr -> His	15	26
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr -> Gln + ⁴²³ Thr -> His	28	49
M ₅ -Wildtyp	93	163

Tabelle 2.8: Auf der Basis von A. Raasch (2003) berechnete Inkubationszeiten für Zweipunkt-kinetische Untersuchungen mit COS7-Membransuspensionen in Abhängigkeit der verschiedenen Rezeptor-Typen. Nähere Erläuterungen finden sich im Text.

Zur Bestimmung der Gesamt- bzw. der unspezifischen Bindung wurden parallel auf der selben Mikrotiterplatte jeweils vier weitere, separate Ansätze vorbereitet. Die

Tabellen 2.9 und 2.10 geben Auskunft über die Art und Menge der dazu eingesetzten Lösungen:

Volumen [μ l]	Art der Lösung	Endkonzentration im Versuchsansatz
10	[3 H]MNS in Aqua dest.	1 nM
90	Inkubationspuffer (L14)	1 mM KH_2PO_4 , 4 mM Na_2HPO_4

Tabelle 2.9: Pipettierschema zur Bestimmung der Gesamtbindung im Rahmen Zweipunkt-kinetischer Experimente mit Membransuspensionen aus COS7-Zellen.

Volumen [μ l]	Art der Lösung	Endkonzentration im Versuchsansatz
10	[3 H]MNS in Aqua dest.	1 nM
80	Inkubationspuffer	1 mM KH_2PO_4 , 4 mM Na_2HPO_4
10	60 μ M Atropin in 5,56 mM Na-K-Phosphat-Puffer	3 μ M

Tabelle 2.10: Pipettierschema zur Bestimmung der unspezifischen Bindung im Rahmen Zweipunkt-kinetischer Experimente mit Membransuspensionen aus COS7-Zellen.

Dreißig Minuten vor der Filtration wurde in jeden der acht Ansätze 100 μ l Membransuspension hinzugegeben, um durch die halbstündige Inkubation identische Bedingungen im Vergleich zu den anderen Ansätzen sicherzustellen.

2.4 Statistische Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten statistischen Verfahren werden nachfolgend kurz erläutert. Aufgeführt sind einige ausgewählte Standard-Methoden, für

tiefergehende Dinge sei auf die einschlägige Literatur verwiesen (z.B. Motulsky, 1995).

Die Angabe der Kenngrößen aller im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Modulatoren erfolgt in Form des mit -1 multiplizierten und logarithmierten Wertes ($pEC_{0,5diss}$, pK_A und $p\alpha$ bzw. $p\beta$). Die nicht logarithmierten Parameter weisen keine lineare Streuung auf, weshalb für sie die Angabe eines beidseitig einheitlichen Standardfehlers nicht möglich ist. Darüber hinaus sollte die Berechnung des Mittelwertes auf der Basis von Werten mit einer linearen Streuung durchgeführt werden, da andernfalls ein Messwert, der von den übrigen deutlich abweicht, einen zu großen Einfluss auf den Mittelwert besitzt (Christopoulos, 1998).

2.4.1 Arithmetisches Mittel

Das arithmetische Mittel \bar{x} kann aus den Einzelwerten x_i gebildet werden, indem deren Summe durch die Anzahl n der Messwerte geteilt wird:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (\text{Gl. 2.26})$$

2.4.2 Standardabweichung

Die Standardabweichung SD ist ein Maß für die Streuung der Messwerte. Sie entspricht der Quadratwurzel der Varianz s^2 und kann folgendermaßen berechnet werden:

$$SD = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Gl. 2.27})$$

2.4.3 Standardfehler des Mittelwertes

Der Standardfehler des Mittelwertes SEM ist der Standardabweichung direkt proportional, es gilt der folgende Zusammenhang:

$$\text{SEM} = \frac{\text{SD}}{\sqrt{n}} \quad (\text{Gl. 2.28})$$

2.4.4 F-Test

Im Rahmen dieser Arbeit gab es einige Situationen, an welchen eine begründete Entscheidung bei der Wahl zwischen zwei verschiedenen mathematischen Modellen getroffen wurde. Dies war beispielsweise der Fall bei der Beurteilung der Steilheit n_H einer Konzentrations-Effekt-Kurve, die mittels computergestützter Regressionsanalyse durch die Messpunkte eines kinetischen Experimentes gelegt wurde (siehe 2.3.1.4). So war es möglich, das Steigungsmaß auf den Wert von -1 zu fixieren, was der Annahme eines einfachen Bindungsverhaltens entspricht, oder alternativ diesen Parameter variabel zu belassen. Würde sich beim statistischen Vergleich dieser beiden Varianten ein signifikanter Unterschied ergeben, wäre die Festsetzung von n_H auf -1 unzulässig und es wäre mit einem komplexen Bindungsverhalten zu rechnen.

Der F-Test dient dem statistischen Vergleich beider Kurvenanpassungen und vergleicht dabei jeweils die Summe der Abstandskvadrat zwischen Messpunkt und Kurvenverlauf (Motulsky, 1995). Diese Größen fließen in die Berechnung des Wertes für F ein, wofür die nachfolgende Gleichung verwendet wird:

$$F = \frac{\frac{SS_a - SS_b}{df_a - df_b}}{\frac{SS_b}{df_b}} \quad (\text{Gl. 2.29})$$

Dabei stehen ss_a bzw. ss_b für die Summe der Abstandsquadrate unter Anwendung der einfachen Gleichung a bzw. der komplexeren Gleichung b mit einer zusätzlichen Variablen (hier n_H) sowie df_a bzw. df_b für die Anzahl der Freiheitsgrade der einfachen Gleichung a bzw. der komplexeren Gleichung b.

Der berechnete F-Wert wird anschließend mit einem tabellierten F-Wert für die zugrundegelegte Irrtumswahrscheinlichkeit – im Rahmen dieser Arbeit war dies $p < 0,05$ – verglichen. Übersteigt dabei der errechnete F-Wert denjenigen aus der Tabelle, so ergibt sich für die Kurve mit dem zusätzlichen Freiheitsgrad und der variablen Steigung eine signifikant bessere Anpassung.

2.4.5 Ungepaarter t-Test

Zur Testung auf eine statistisch signifikante Differenz zwischen den Mittelwerten der Kenngrößen der einzelnen Modulatoren wurde ein zweiseitiger, ungepaarter t-Test durchgeführt, wobei eine notwendige Voraussetzung für dieses Vorgehen das Vorliegen einer Gauss'schen Normalverteilung der Messdaten ist.

Vor dem eigentlichen t-Test wurde zunächst mittels eines F-Testes die statistische Differenz zwischen den jeweiligen Standardfehlern überprüft. Ergab sich dabei eine Signifikanz, wurde im nachfolgenden t-Test eine Korrektur nach Welch integriert, ansonsten wurde er unverändert durchgeführt. Die Signifikanzgrenze für diese wie für alle übrigen statistischen Berechnungen dieser Arbeit wurde bei $p = 0,05$ gezogen.

2.5 Eingesetzte Verbindungen

In diesem Kapitel werden die innerhalb der Radioligand-Bindungsstudien dieser Arbeit verwendeten Substanzen näher vorgestellt.

2.5.1 Orthosterische Muskarin-Rezeptor-Liganden

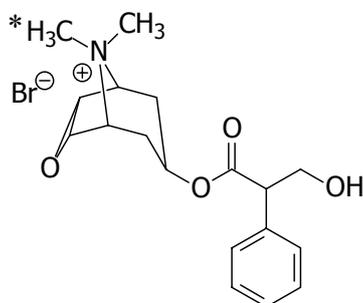


Abbildung 2.1: Strukturformel des Muskarin-Rezeptor-Antagonisten *N*-Methyl- bzw. [^3H]*N*-Methyl-Scopolamin-Bromid. Die Position der radioaktiven Markierung ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet, die spezifische Aktivität des Radioliganden betrug, je nach Charge, 81,0 bzw. 83,5 Ci/mmol.

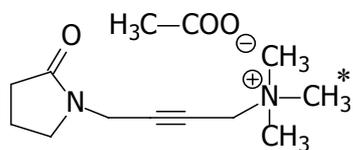


Abbildung 2.2: Strukturformel des Muskarin-Rezeptor-Agonisten [^3H]Oxotremorin-M-Acetat. Die Position der radioaktiven Markierung ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet, die spezifische Aktivität des Radioliganden betrug 86,4 Ci/mmol. Ebenfalls eingesetzt wurde die nicht markierte Substanz, sie lag als Iodid-Salz vor.

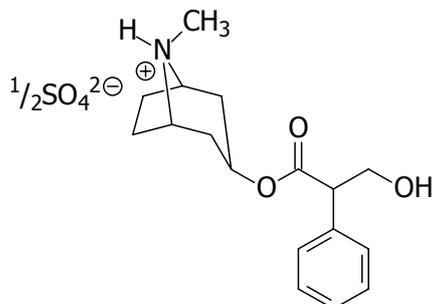


Abbildung 2.3: Strukturformel des Muskarin-Rezeptor-Antagonisten Atropin-Sulfat.

2.5.2 Allosterische Muskarin-Rezeptor-Liganden

2.5.2.1 Silizium-haltige Verbindungen

Die nachfolgend aufgeführten Silizium-haltigen allosterischen Modulatoren wurden allesamt von Herrn Dr. J. O. Daiss aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R. Tacke, Universität Würzburg, Institut für Anorganische Chemie, synthetisiert und dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.

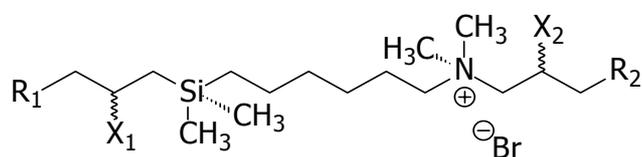
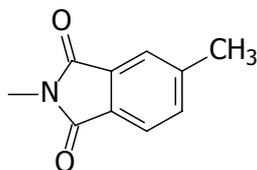


Abbildung 2.4: Grundgerüst aller monokationischen Silizium-haltigen Modulatoren.

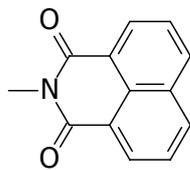
-R ₁	-R ₂	-X ₁	-X ₂	Substanz-
				Bezeichnung
Phth	Phth	H	H	TD2
Phth	Mephth	H	H	TD12
Mephth	Phth	H	H	TD21
Mephth	Mephth	H	H	TD17
Phth	Phth	H	CH ₃	TD23
Phth	Phth	CH ₃	H	TD24
Phth	Naphth	H	H	TD15
Naphth	Phth	H	H	TD16
Naphth	Naphth	H	H	TD14
Naphth	Mephth	H	H	TD18
Mephth	Naphth	H	H	TD20
Naphth	Succ	H	H	TD19
Succ	Naphth	H	H	TD25
Succ	Succ	H	H	TD22

Tabelle 2.11: Substitutionsmuster der monokationischen Silizium-haltigen Verbindungen.

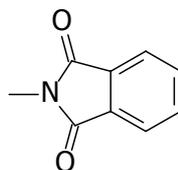
Die in Tabelle 2.11 verwendeten Abkürzungen „Mephth“, „Naphth“, „Phth“ sowie „Succ“ bezeichnen die folgenden Strukturelemente:



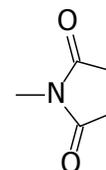
5-Methylphthalimid-
Rest



Naphthalimid-
Rest



Phthalimid-
Rest



Succinimid-
Rest

Neben diesen vierzehn jeweils einfach positiv geladenen Silizium-haltigen Substanzen wurde zusätzlich die Verbindung TD32 auf ihre allosterischen Eigenschaften hin untersucht. Sie weicht strukturell von den übrigen Silizium-haltigen Modulatoren ab, da sie aufgrund eines tertiären Stickstoffes nicht permanent positiv geladen ist:

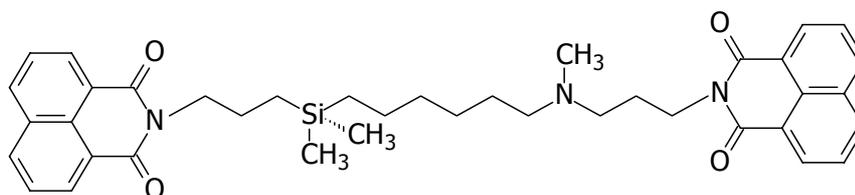


Abbildung 2.5: Strukturformel des ungeladenen, Silizium-haltigen Modulators TD32.

2.5.2.2 Alkan-Bisammonium-Verbindungen

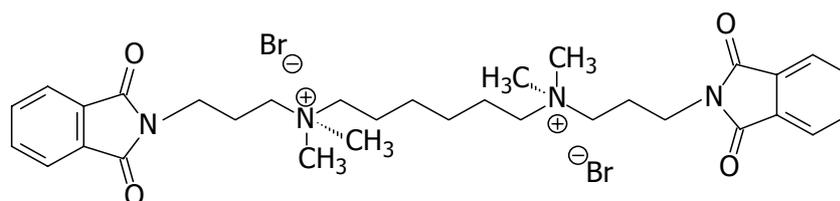


Abbildung 2.6: Strukturformel des Prototyp-Modulators W84. Die Verbindung wurde synthetisiert und dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. J. Pfeffer, Universität Kiel, Institut für Pharmakologie.

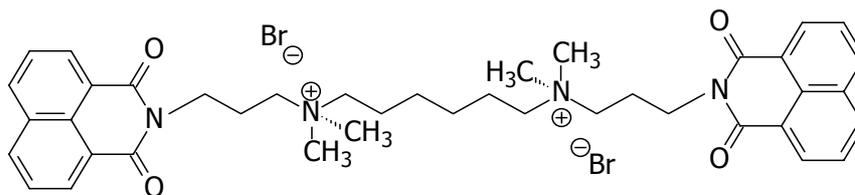


Abbildung 2.7: Strukturformel des Modulators WB64. Die Verbindung wurde synthetisiert und dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. W. Bender, Universität Würzburg, Institut für Pharmazeutische Chemie.

2.6 Verwendete Materialien und Reagenzien

Nachfolgend werden in tabellarischer Form alle Materialien (Tabelle 2.12) bzw. Reagenzien (Tabelle 2.13) aufgeführt, die im Zuge dieser Arbeit eingesetzt wurden; dabei werden sie den in den bisherigen Kapiteln verwendeten Kürzeln zugeordnet. Details zu den nur verkürzt genannten Herstellern finden sich in Tabelle 2.14.

2.6.1 Materialien

Kürzel	Material	Artikel-Nr.	Hersteller
M1	Waring-Blendor-Homogenisator		Waring
M2	Potter-Elvehjem-Glashomogenisator		JanKun
M3	Ultrazentrifuge Beckman L7-35		BeckIn
M4	Eppendorf Reaktionsgefäß (4000 Stück)	616201	Greiner
M5	Herasafe-Werkbank HS15, Klasse II		Heraeus
M6	ThermoForma Series II Water Jacketed CO ₂ -Inkubator		TherFor
M7	Gewebekulturschale, steril, 145/20 mm	639160	Greiner
M8	SFCA Bottle Top Filter, 150 ml	290-4520	Nalge
M9	Kryovial (500 Stück)	123263	Greiner
M10	Falcon-tubes, steril, 50 ml (500 Stück)	227261	Greiner
M11	Centrifuge 5417 C		Eppen
M12	Gewebekulturschale, steril, 100/20 mm	664160	Greiner
M13	Orbital Shaker Model 420		TherFor

Kürzel	Material	Artikel-Nr.	Hersteller
M14	Quiagen Plasmid Maxi Kit	12162	Quiagen
M15	Centrifuge Avanti J-20 XP		BeckCo
M16	Ultrospec 3300 pro		Biochrom
M17	Neubauer Zählkammer	631-1110	VWR
M18	Axiovert 25		Zeiss
M19	Cell-Scraper, steril, 25 cm	83.1830	Sarstedt
M20	Polytron-Homogenisator		Kinema
M21	Erlenmeyer-Kolben 50 ml		Labomedic
M22	MSI Minishaker		IKA
M23	Wasserbad GFL 1086		GFL
M24	Glasfaser-Rundfilter GF6, \varnothing 25 mm (200 Stück)	10370018	Schleicher
M25	Polyethylen-Szintillationsgefäß mit Schraubdeckel, 21 ml (1000 Stück)		Fisher
M26	Beckman LS 6000 SC		BeckCo
M27	Janke & Kunkel ES 5		JanKun
M28	Mikrotiterplatte mit 96 Bohrungen (50 Stück)	AB-0564	Abgene
M29	Bedruckte Filtermatte, 90 x 120 mm (100 Stück)	1450-421	PerkinEID
M30	Harvester 96, Model Mach 3		Tomtec
M31	MultiLex A	1450-441	PerkinEID
M32	Techne Dri-Block DB-2A		Techne
M33	1450 MicroBeta Trilux		PerkinEID

Tabelle 2.12: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Materialien.

2.6.2 Reagenzien

Kürzel	Reagenz	Artikel-Nr.	Hersteller
R1	Saccharose (1 kg)	1.07687.1000	Merck
R2	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (500 g)	1.08382.0500	Merck
R3	Salzsäure 1 N (1 l)	23204	Grüssing
R4	Humanes Serumalbumin (Fraktion V, 5 g)	A-1653	Sigma
R5	Dulbecco´s Modified Eagles Medium (DMEM, 500 ml)	D-5796	Sigma
R6	Fötale Kälberserum (FKS, 500 ml)	F-7524	Sigma
R7	Penicillin (10000 U/ml)-Streptomycin (1000 μ g/ml)-Lösung (100 ml)	P-0781	Sigma

Kürzel	Reagenz	Artikel-Nr.	Hersteller
R8	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Pulver für 10 x 1 l)	D-5652	Sigma
R9	Trypsin-EDTA-Lösung (100 ml)	T-3924	Sigma
R10	Dimethylsulfoxid (DMSO, 1 l)	D-5879	Sigma
R11	Luria-Bertani-Medium-Pulver (1 kg)	L-3522	Sigma
R12	Ampicillin-Natrium (5 g)	A-9518	Sigma
R13	Glycerol 99 % (500 ml)	G-5516	Sigma
R14	Ethylendiaminotetraessigsäure (100 g)	E-9884	Sigma
R15	Natronlauge 1 N (1 l)	35256	Grüssing
R16	Isopropanol, absolut (1 l)	59304	Fluka
R17	Ethanol 99,8 % (2,5 l)	9065.2	Roth
R18	Aqua pro analysi (5 l)	1.16754.5000	Merck
R19	PolyFect [®] Transfektionsreagenz (4 x 1 ml)	301107	Quiagen
R20	KH ₂ PO ₄ (500 g)	P-5379	Sigma
R21	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (1 kg)	S-0876	Sigma
R22	Phosphorsäure 85% (100 g)	P-5811	Sigma
R23	[³ H]N-Methyl-Scopolamin-Bromid (1 ml)	NET 636	PerkinElu
R24	[³ H]Oxotremorin-M-Acetat (250 µl)	NET 671	PerkinElu
R25	MgHPO ₄ x 3 H ₂ O (250 g)	63080	Fluka
R26	Atropin-Sulfat (5 g)	A-0257	Sigma
R27	Sigmacote [®] (100 ml)	SL-2	Sigma
R28	Ready Protein + (4 x 3,75 l)	586604	BeckCo
R29	N-Methyl-Scopolamin-Bromid (5 g)	S-8502	Sigma
R30	Oxotremorin-M-Iodid (100 mg)	O-100	Sigma
R31	wässrige Polyethylenimin-Lösung 50% (100 ml)	P-3143	Sigma

Tabelle 2.13: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Reagenzien.

2.6.3 Kurzbeschreibungen der Herstellerfirmen

Kürzel	Hersteller
ABgene	Abgene House, Epsom, Surrey, Grossbritannien
BeckCo	Beckman Coulter GmbH, Unterschleissheim, Deutschland
BeckIn	Beckman Industries, Palo Alto, USA
Biochrom	Biochrom LTD, Cambridge, Grossbritannien
Eppen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Fisher	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Fluka	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

Kürzel	Hersteller
GFL	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Greiner	Greiner-Bio-One, Solingen, Deutschland
Grüssing	Grüssing Diagnostika Analytika, Filsung, Deutschland
Heraeus	Heraeus, Hilden, Deutschland
IKA	IKA Werke, Staufen, Deutschland
JanKun	Janke und Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Kinema	Kinematica AG, Littau-Luzern, Schweiz
Labomedic	Labomedic, Bonn, Deutschland
Merck	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nalge	Nalge Nunc International, Rochester, New York, USA
PerkinEID	Perkin Elmer Life Science GmbH, Rodgen-Jügesheim, Deutschland
PerkinEIU	Perkin Elmer Life and Sciences, Boston, Maryland, USA
Quiagen	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Roth	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Sarstedt	Sarstedt Inc., Newton, North Carolina, USA
Schleicher	Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland
Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Techne	Techne LTD, Duxford, Cambridge, Grossbritannien
TherFor	Thermo Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA
Tomtec	Tomtec, Hamden, Connecticut, USA
VWR	VWR International, Langenfeld, Deutschland
Waring	Waring, New Hartford, USA
Zeiss	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

Tabelle 2.14: Entschlüsselung der in Tabelle 2.12 und 2.13 verwendeten Herstellerkürzel.

2.7 Verwendete Lösungen

Innerhalb dieser Arbeit wurde eine Reihe von Lösungen eingesetzt, die nicht in fertiger Form bezogen, sondern angefertigt wurden. Nachfolgend wird ihre Herstellung näher beschrieben, zusätzlich finden sich Angaben zu den optimalen Lagerungsbedingungen sowie zur jeweiligen Verwendungsdauer, falls diese stark begrenzt ist.

Saccharose-Lösung, 0,32 M (L1)

109,54 g Saccharose (R1) in 1,0 l Aqua dest. lösen. Bei 2 – 8 °C lagern.

Tris-HCl-Puffer, 50 mM (L2)

1,51 g Tris (R2) in etwa 200 ml Aqua dest. lösen und mit Salzsäure (R3) auf pH 7,30 einstellen, dann mit Aqua dest. auf 250,0 ml auffüllen. Bei 2 – 8 °C lagern.

Steriler PBS-Puffer (L3)

Eine Packung PBS-Fertigpulver (R8) in 1,0 l Aqua dest lösen und unter der Werkbank mit Hilfe spezieller Einwegfilter (M8) sterilfiltrieren. Bei 2 – 8 °C lagern.

Luria-Bertani (LB)-Medium, ampicillin-haltig (L4)

12,5 g LB-Medium-Fertigpulver (R11) in 500,0 ml Aqua dest. lösen und für 25 Minuten bei 121 °C autoklavieren. Nach dem Abkühlen 500,0 µl Ampicillin-Lösung (L5) mit steriler Pipette zugeben. Vor der Verwendung frisch herstellen.

Sterile Ampicillin-Lösung (L5)

750,0 mg Ampicillin-Natrium (R12) in 15,0 ml Aqua dest. lösen, unter der Werkbank mit Hilfe spezieller Einwegfilter sterilfiltrieren und je 550,0 µl in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotieren. Bei –20 °C lagern.

Sterile Glycerol-Lösung, 60 %ig (L6)

30,3 ml 99 %iges Glycerol (R13) mit Aqua dest. auf 50,0 ml auffüllen. Unter der Werkbank mit Hilfe spezieller Einwegfilter sterilfiltrieren. Bei 2 – 8 °C lagern.

Steriler Tris-EDTA-Puffer, 10 mM (L7)

Etwa 60 ml Aqua dest. vorlegen und darin 29,22 mg EDTA (1 mM, R14) unter Zugabe von Natronlauge (R15) lösen; danach 121,14 mg Tris (10 mM) zugeben und mit Salzsäure auf pH 8,0 einstellen. Mit Aqua dest. auf 100,0 ml auffüllen und unter der Werkbank mit Hilfe spezieller Einwegfilter sterilfiltrieren. Bei 2 – 8 °C lagern.

Ethanol-Lösung, 70 %ig (L8)

70,14 ml 99,8 %iges Ethanol (R17) mit Aqua dest. auf 100,0 ml auffüllen. Bei 2 – 8 °C lagern.

Na-K-Phosphat-Puffer, 5 mM (L9)

Zur Herstellung einer 50 mM Stammlösung 1,36 g KH_2PO_4 (10 mM, R20) und 7,12 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (40 mM, R21) in etwa 900 ml Aqua dest. lösen und mit 1 N Phosphorsäure (L10) auf pH 7,40 einstellen. Dann mit Aqua dest. auf 1,0 l auffüllen und einen Teil dieser Lösung mit neun Teilen Aqua dest. verdünnen. Bei 2 – 8 °C lagern.

Phosphorsäure, 1 N (L10)

2,04 ml 85 %ige Phosphorsäure (R22) mit Aqua dest. auf 100,0 ml auffüllen.

Mg-Phosphat-Tris-Inkubationspuffer (L11)

Bei allen Radioligand-Bindungsstudien, die unter Verwendung von Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe durchgeführt wurden, kam ein Mg-Phosphat-Tris-Puffer zum Einsatz, der im Versuchsansatz eine Endkonzentration von 3 mM Mg^{2+} und 50 mM Tris-HCl aufwies. Da die Volumen-Anteile des Puffers am Gesamtvolumen des jeweiligen Ansatzes nicht identisch waren (siehe Tabellen 2.2, 2.3 und 2.4), war die Herstellung zweier, unterschiedlich konzentrierter Mg-Phosphat-Tris-Pufferlösungen notwendig. Die nachfolgend vor dem Trennstrich genannten Einwaagen beziehen sich auf den Puffer, der im Rahmen von homologen Kompletions- bzw. heterologen Interaktionsstudien Verwendung fand, die dahinter stehenden Einwaagen beziehen sich auf den Puffer bei kinetischen Untersuchungen.

177,8 mg/186,8 mg $MgHPO_4 \times 3 H_2O$ (R25) unter Zugabe von Salzsäure in etwa 200 ml Aqua dest. lösen. Anschließend 1,72 g/1,80 g Tris zugeben, mit Salzsäure auf pH 7,30 einstellen und mit Aqua dest. auf 250,0 ml auffüllen. Beide Puffer bei 2 – 8 °C lagern, sie sind nach der Herstellung nur wenige Tage einsetzbar.

Polyethylenimin (PEI)-Lösung, 0,25/0,1 %ig (L12/L15)

Beide Lösungen wurden ausgehend von einer 1 %igen PEI-Stammlösung hergestellt, welche durch Mischung von 20,0 g 50 %igem PEI (R31) mit 980,0 ml Aqua dest. erhalten wurde. Ein Teil dieser Stammlösung wurde für die 0,25 %ige PEI-Lösung mit drei Teilen Aqua dest. verdünnt, für die 0,1%ige PEI-Lösung waren es neun Teile Aqua dest., die zugegeben wurden.

Mg-Phosphat-Tris-Spülpuffer (L13)

130,8 mg $\text{MgHPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$ (3 mM) unter Zugabe von Salzsäure in etwa 200 ml Aqua dest. lösen. Anschließend 1,51 g Tris (50 mM) zugeben, mit Salzsäure auf pH 7,30 einstellen und mit Aqua dest. auf 250,0 ml auffüllen. Bei 2 – 8 °C lagern, der Puffer ist nach der Herstellung nur wenige Tage einsetzbar.

Na-K-Phosphat-Inkubationspuffer (L14)

Zur Herstellung einer zehnfach konzentrierteren Stammlösung 1,51 g KH_2PO_4 und 7,90 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ in etwa 900 ml Aqua dest. lösen und mit 1 N Phosphorsäure auf pH 7,40 einstellen. Anschließend mit Aqua dest. auf 1,0 l auffüllen und einen Teil dieser Lösung mit neun Teilen Aqua dest. verdünnen. Bei 2 – 8 °C lagern.

2.8 Verwendete Computer-Programme

Nachfolgend sind die Computer-Programme aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit benutzt wurden:

ChemWindow[®] (Version 6.0) zur Darstellung chemischer Strukturformeln (Bio-Rad Laboratories, Sadtler Division, Philadelphia, USA).

GraphPad InStat[®] (Version 3.0) zur statistischen Analyse der Messdaten dieser Dissertationsschrift (GraphPad Software, San Diego, USA).

GraphPad Prism[®] (Version 3.02) zur Auswertung und graphischen Darstellung der Messdaten der einzelnen Radioligand-Bindungsstudien (GraphPad Software, San Diego, USA).

Microsoft Excel® 2000 zur Auswertung der Proteinbestimmungen sowie zur Erstellung sämtlicher Tabellen dieser Dissertationsschrift (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

Microsoft PowerPoint® 2000 zur Erstellung einiger Abbildungen dieser Dissertationsschrift (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

Microsoft Word® 2000 zur Erstellung dieser Dissertationsschrift (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe

Die Bindungseigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe hergestellten Membransuspensionen wurden mit Hilfe homologer Konkurrenzexperimente ermittelt. Die experimentelle Durchführung erfolgte in einem Mg-Phosphat-Tris-Inkubationspuffer bei pH 7,3 und 37 °C gemäß der in 2.3.2.1.1 erläuterten Methodik. Ziel dieser Experimente war die Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_D als Maß für die Affinität des Radioliganden ($[^3H]NMS$ bzw. $[^3H]OxoM$) zu freien Rezeptoren sowie die Gesamtzahl der Bindungsstellen (B_{max}) für den Radioliganden. Die Berechnung der Kenngrößen erfolgte für K_D nach Cheng und Prusoff (Gleichung 2.12) sowie für B_{max} nach DeBlasi (Gleichung 2.14) in Verbindung mit dem Ergebnis der Proteinbestimmung (siehe Tabelle 2.1).

Abbildung 3.1 stellt ein repräsentatives Beispiel für eine Konzentrations-Bindungs-Kurve dar, die unter Verwendung von [³H]NMS zustande kam. Sie wurde durch nichtlineare Analyse der Messdaten nach der „4-Parameter-logistischen Gleichung“ (Gleichung 2.9) erstellt.

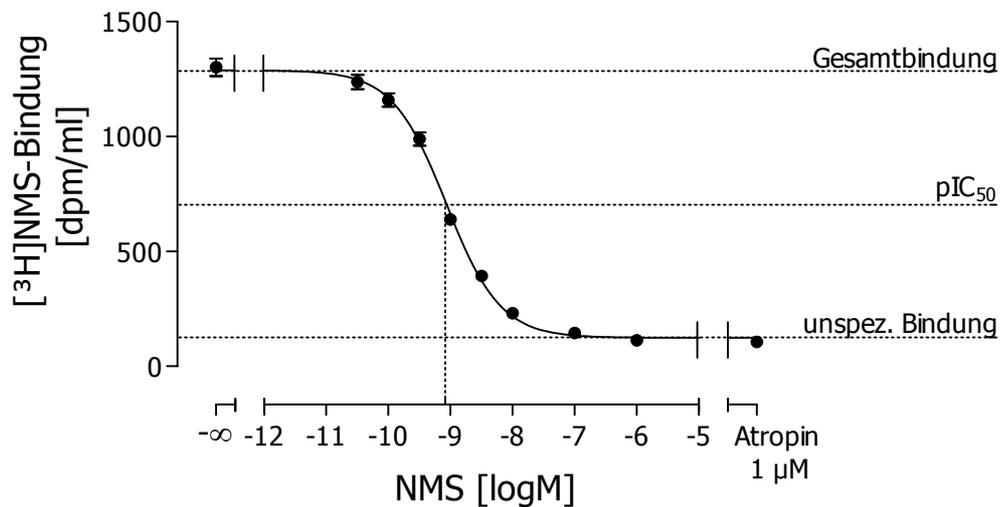


Abbildung 3.1: Konzentrations-Effekt-Kurve eines repräsentativen homologen Konkurrenzexperimentes zwischen [³H]NMS (0,2 nM) und steigenden Konzentrationen NMS zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften einer Membransuspension aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C. *Ordinate:* [³H]NMS-Bindung in dpm/ml; *Abszisse:* Logarithmus der molaren NMS-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten. Das Steigungsmaß n_H der Kurve betrug $-0,94$, es unterschied sich nicht signifikant von -1 und wurde daher auf diesen Wert festgesetzt. Weitere Erläuterungen finden sich im Text.

Die Bestimmung der Gesamtbinding als Summe der spezifischen sowie der unspezifischen Bindung erfolgte unter Abwesenheit des nicht radioaktiv-markierten Kompetitors NMS. Mit steigender Konzentration von NMS wurde die orthosterische Bindungsstelle zunehmend von diesem Kompetitor besetzt, was die spezifische Radioligand-Bindung kontinuierlich verminderte. Die unspezifische Bindung wurde unter Einsatz von 1 μ M Atropin quantifiziert.

Der Wendepunkt der Kurve in Abbildung 3.1 ist gleichbedeutend mit dem IC₅₀-Wert und bezeichnet diejenige NMS-Konzentration, bei welcher die anfängliche spezifische Radioligand-Bindung auf die Hälfte reduziert wurde. In diesem Beispiel beläuft sich IC₅₀ auf 0,86 nM, die daraus abgeleiteten Parameter K_D und B_{max} betragen 0,67 nM bzw. 228 fmol/mg Protein, wobei die Verdünnung der Membransuspension im Experiment bei der Berechnung von B_{max} berücksichtigt wurde.

Die Tabellen 3.1 und 3.2 enthalten, getrennt für die verwendeten Radioliganden $[^3\text{H}]\text{NMS}$ und $[^3\text{H}]\text{OxoM}$, eine Zusammenstellung der pK_D - und B_max -Werte aller im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe.

Membransuspension (Tag der Präparation)	pK_D	B_max [fmol/mg Protein]
24.09.2001	9,35 ± 0,08	74 ± 6
24.01.2002	9,31 ± 0,14	51 ± 4
20.02.2002	9,24 ± 0,02	60 ± 1
13.05.2002	9,31 ± 0,07	48 ± 5
20.06.2002	9,37 ± 0,04	66 ± 2
10.07.2002	9,32 ± 0,02	60 ± 6
04.12.2002	9,33 ± 0,08	50 ± 3
24.02.2003	7,95 ± 0,04	27 ± 0
08.05.2003	8,07 ± 0,03	25 ± 1
10.06.2003	7,80 ± 0,11	25 ± 5
10.06.2003	9,48 ± 0,05	51 ± 4
27.10.2003	9,26 ± 0,07	74 ± 7
Mittelwert ± Standardfehler	9,33 ± 0,02	59 ± 3

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der mittels homologer Konkurrenzexperimente unter Verwendung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ bestimmten Bindungs-Parameter für die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C. Weitere Erläuterungen finden sich in der Legende zu Tabelle 3.2.

Membransuspension (Tag der Präparation)	pK_D	B_max [fmol/mg Protein]
24.02.2003	7,95 ± 0,04	27 ± 0
08.05.2003	8,07 ± 0,03	25 ± 1
10.06.2003	7,80 ± 0,11	25 ± 5
Mittelwert ± Standardfehler	7,94 ± 0,08	26 ± 1

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der mittels homologer Konkurrenzexperimente unter Verwendung von $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ bestimmten Bindungs-Parameter für die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C.

Das Steigungsmaß n_H war bei keinem der in den Tabellen 3.1 und 3.2 zusammengefassten Experimente signifikant unterschiedlich von -1 (F-Test). Die pK_D -Werte wurden nach Cheng & Prusoff (Gleichung 2.12) ermittelt, die Werte für B_max wurden rechnerisch bestimmt nach DeBlasi (Gleichung 2.14) und dem Proteingehalt der jeweiligen Membransuspension (Tabelle 2.1). Angegeben sind die Parameter-Mittelwerte ± Standardfehler aus jeweils drei unabhängigen Experimenten.

Die gemittelten Bindungs-Parameter betragen für die Untersuchungen mit dem Radioliganden [³H]NMS $pK_D = 9,33 \pm 0,02$ und $B_{max} = 59 \pm 3$ fmol/mg Protein (Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 9$) bzw. $pK_D = 7,94 \pm 0,08$ und $B_{max} = 26 \pm 1$ fmol/mg Protein (Mittelwert \pm Standardfehler, $n = 3$) für die Experimente mit [³H]OxoM.

3.2 Beeinflussung der [³H]NMS-Dissoziation sowie der [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung an M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben W84, einem Prototyp-Modulator aus der Gruppe der Alkan-Bisammonium-Verbindungen, eine Reihe von Silizium-analogen Verbindungen auf ihre allosterischen Eigenschaften hin untersucht. Deren Einfluss auf die Dissoziation des Radioliganden [³H]NMS von M₂-Rezeptoren aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe wurde in kinetischen Experimenten geprüft, wobei jeweils komplette Dissoziationskurven erstellt wurden. Die experimentelle Durchführung erfolgte jeweils in einem Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C gemäß der in 2.3.2.1.3 erläuterten Methodik.

Die gemessenen Bindungsdaten wurden in Abhängigkeit der Zeit analysiert. Bedingt durch die Überschuss-Zugabe des Kompetitors Atropin wurde eine Reassozi-ation von bereits abdissoziierten Radioligand-Molekülen verhindert, so dass deren spezifische Bindung infolge des Zerfalles der Radioligand-Rezeptor-Komplexe zunehmend vermindert wurde.

In Abbildung 3.2 sind beispielhaft einige repräsentative Dissoziationskurven gezeigt, die durch den Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen des Modulators W84 entstanden sind. Die Messpunkte wurden dabei mittels monoexponentieller Regression analysiert.

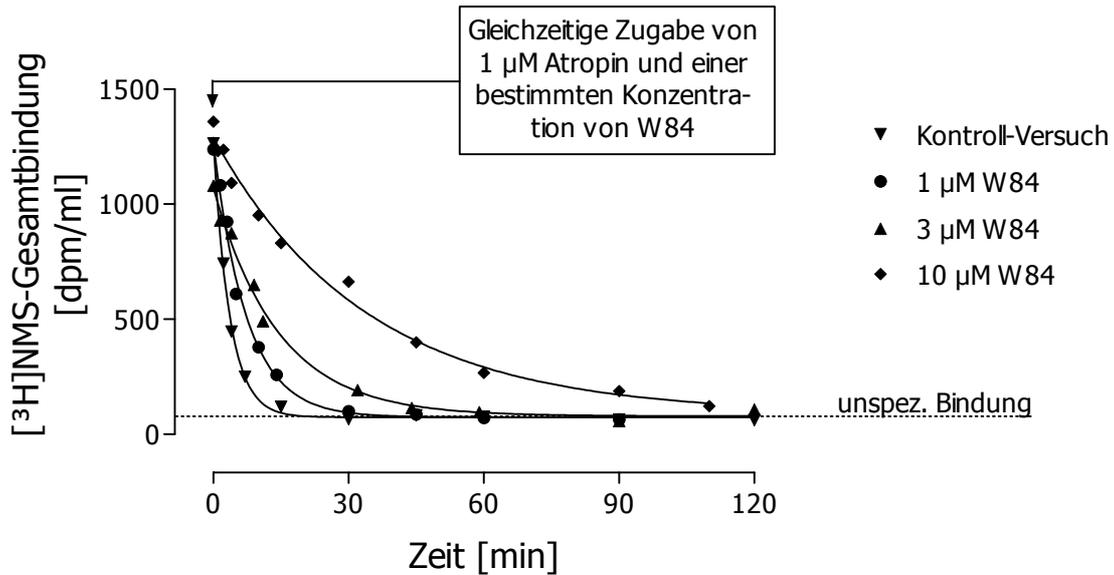


Abbildung 3.2: Dissoziationskurven als Ergebnis repräsentativer kinetischer Experimente unter Verwendung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ ($0,2 \text{ nM}$), verschiedenen Konzentrationen des allosterischen Modulators W84 sowie einer Membransuspension aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und $37 \text{ }^\circ\text{C}$. *Ordinate:* $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gesamtbindung in dpm/ml Versuchsansatz; *Abszisse:* Zeit nach Zugabe des Atropin-Alloster-Gemisches als Startpunkt der Dissoziationsmessung in min.

Ein wichtiges Kennzeichen der Dissoziationskurven stellt die Geschwindigkeits-Dissoziationskonstante k_{-1} (siehe 2.3.1.4) dar. Die k_{-1} -Werte der durch die Einwirkung eines Modulators entstandenen Kurven können in Relation zum Zahlenwert der Kontrollkurve gesetzt und in Abhängigkeit der Modulator-Konzentration mittels nicht linearer Regression analysiert werden. Daraus ergibt sich eine Konzentrations-Effekt-Kurve, wie sie für W84 in Abbildung 3.3 gezeigt ist. Die in kinetischen Studien mit Membransuspensionen des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und $37 \text{ }^\circ\text{C}$ gemessene mittlere Halbwertszeit der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation beträgt unter Kontrollbedingungen $t_{1/2} = 2,74 \pm 0,09 \text{ min}$, der gemittelte Zahlenwert der Geschwindigkeits-Dissoziationskonstanten beläuft sich auf $k_{-1} = 0,27 \pm 0,01$ (Angaben jeweils im Form des Mittelwertes \pm deren Standardfehler für $n = 62$).

Der in Abbildung 3.3 eingezeichnete $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$ -Wert bezeichnet diejenige Modulator-Konzentration, bei welcher die Geschwindigkeit der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation auf die Hälfte des Ausgangswertes in Abwesenheit einer Testsubstanz erniedrigt wurde. Diese Konzentration kann auch als ein Maß für die Affinität des allosterischen Modulators zu Orthoster-besetzten Rezeptoren betrachtet werden.

Das obere Kurvenplateau Max wurde hier, wie bei allen untersuchten Modulatoren, auf den Zahlenwert von 100 % festgesetzt. Dieses Vorgehen wird dadurch gerechtfertigt, dass es durch den Einsatz sehr kleiner Modulator-Konzentrationen nicht zu einer Veränderung der [³H]NMS-Dissoziations-Geschwindigkeit im Vergleich zu den Kontrollbedingungen kommen kann. Die Studien, die innerhalb dieser Arbeit durchgeführt wurden, bestätigen diese Überlegung. Für keine Substanz konnte mittels F-Test eine signifikante Differenz zwischen einem auf 100 % konstant gesetzten und einem freilaufenden oberen Plateau festgestellt werden.

Bei der Bestimmung des unteren Kurvenplateaus Min wurde hingegen anders verfahren, da sich, auch im Rahmen dieser Arbeit, Beispiele für eine komplette wie auch für eine unvollständige Dissoziationsunterdrückung finden lassen. Mit Hilfe eines F-Testes wurde für jede Kurve überprüft, ob die Lage des unteren Plateaus signifikant von 0 % abweicht. War dies nicht der Fall, so war eine vollständige Dissoziationsverzögerung des Radioliganden durch den Modulator möglich und das untere Plateau wurde auf Min = 0 % festgesetzt.

Ähnlich wurde bezüglich des Steigungsmaßes n_H der Kurven vorgegangen. Auch hier wurde mit einem F-Test untersucht, ob sich sein Zahlenwert signifikant von einem Bezugswert, hier -1, unterscheidet. Ergab der statistische Vergleich keinen signifikanten Unterschied, wurde der Steigungskoeffizient auf n_H = -1 festgesetzt.

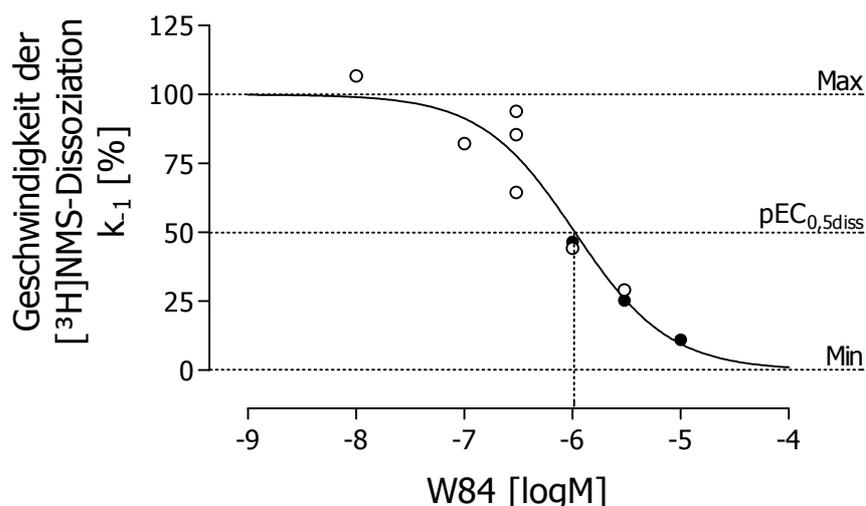


Abbildung 3.3: Konzentrations-Effekt-Kurve von W84 zur Illustration seines Einflusses auf die Geschwindigkeit der [³H]NMS-Dissoziation. Die ausgefüllten Symbole gehen auf die in Abbildung 3.2 enthaltenen Dissoziationskurven zurück. Entgegen der sonst verwendeten Darstellungsart sind zur Illustration der Methodik alle Versuche in Form einzelner Symbole angegeben. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante k₋₁ der [³H]NMS-Dissoziation in Prozent bezogen auf die Kontrolle in Abwesenheit des Modulators; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren W84-Konzentration. Weitere Erläuterungen finden sich im Text.

Der Einfluss verschiedener allosterischer Modulatoren auf die Gleichgewichtsbindung des Radioliganden [^3H]NMS an M_2 -Rezeptoren aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe wurde mit Hilfe heterologer Interaktionsexperimente untersucht. Die experimentelle Durchführung erfolgte jeweils in einem Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C gemäß der in 2.3.2.1.2 erläuterten Methodik.

Die gemessenen Bindungsdaten wurden in Abhängigkeit des dekadischen Logarithmus der Modulator-Konzentration unter Verwendung des ternären Modells allosterischer Interaktion (Gleichung 2.17) analysiert. Mit Hilfe des Wendepunktes der sigmoiden Konzentrations-Effekt-Kurve heterologer Interaktionsexperimente (vergleiche Abbildung 1.2) kann die Affinität pK_A des Modulators zu freien Rezeptoren errechnet werden. Dies ist bei neutral kooperativen Modulatoren nicht möglich, K_A wird hier anhand des Quotienten $EC_{0,5diss}/\alpha$ berechnet (siehe 2.3.1.3). Neben dem pK_A -Wert wurde auch der Kooperativitätsfaktor α für jeden Modulator bestimmt.

Für jeden allosterischen Modulator wurde anhand von Gleichung 2.15 diejenige fraktionelle Rezeptorbesetzung B_f mit [^3H]NMS berechnet, die sich unter Verwendung hoher Substanz-Konzentrationen einstellt. Damit sollte geprüft werden, ob bei positiv kooperativen Modulatoren der Anstieg der [^3H]NMS-Bindung die maximal mögliche fraktionelle Rezeptorbesetzung von 100 % nicht übersteigt. Dies war in allen entsprechenden Experimenten der Fall.

Zudem wurde für jede Testsubstanz die Übereinstimmung der Befunde aus heterologen Interaktionsstudien mit denen kinetischer Untersuchungen unter dem Aspekt des Kooperativitätsmodells überprüft. Danach müsste das Produkt $\alpha \cdot K_A$ identisch sein mit $EC_{0,5diss}$, die beide ein Maß für die Affinität des Modulators zu [^3H]NMS-besetzten Rezeptoren darstellen. Für die innerhalb dieser Arbeit getesteten Verbindungen beläuft sich die größte gefundene Differenz zwischen $p(\alpha \cdot K_A)$ und $pEC_{0,5diss}$ auf 0,46 (TD22), so dass die Ergebnisse aus den beiden Arten von Radioligand-Bindungsstudien jeweils in gutem Einklang zueinander stehen.

3.2.1 Unsubstituierte Modulatoren

Vor der Untersuchung systematisch veränderter Verbindungen wurden zunächst die Eigenschaften der Substanzen W84 und TD2 ermittelt. Bei W84 handelt es sich um den bekanntesten Vertreter der Alkan-Bisammonium-Verbindungen. Die Effekte beider Verbindungen sind bereits gut bekannt, so dass an dieser Stelle nur eine verminderte Anzahl unabhängiger Experimente durchgeführt wurde, um zu prüfen, ob die Befunde denjenigen der Voruntersucher entsprechen.

Der Einfluss von W84 und TD2 auf die [³H]NMS-Dissoziation ist in Abbildung 3.4 sowie Tabelle 3.3 dargestellt, die konzentrationsabhängigen Modulator-Effekte auf die Gleichgewichtsbindung des Radioliganden können Abbildung 3.5 und Tabelle 3.4 entnommen werden.

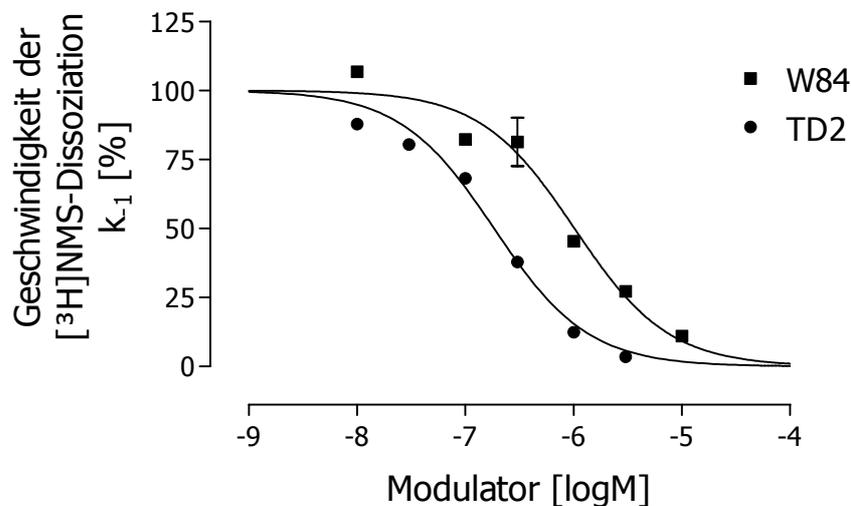


Abbildung 3.4: Konzentrations-Effekt-Kurven von W84 und TD2 zur Illustration ihres Einflusses auf die Geschwindigkeit der [³H]NMS-Dissoziation an M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante k_{-1} der [³H]NMS-Dissoziation in Prozent bezogen auf die Kontrolle in Abwesenheit des Modulators; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus zwei bis drei unabhängigen Experimenten.

Untersuchter Modulator	$pEC_{0,5diss}$	n_H	Min [%]
W84	$5,99 \pm 0,07$	$-1,01 \pm 0,18^{ns}$	$2,2 \pm 10,2^{ns}$
TD2	$6,73^s, p < 0,01$ (6,70; 6,77)	-0,99 (-0,99 ^{ns} ; -0,99 ^{ns})	-3,3 (-3,5 ^{ns} ; -3,2 ^{ns})

Tabelle 3.3: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.4 ermittelte Parameter. ^{ns}: Nicht signifikanter Unterschied der Kurvensteilheit n_H zu -1 bzw. des unteren Kurvenplateaus Min zu 0 % (F-Test), daher erfolgte die Kurvenanpassung für die $pEC_{0,5diss}$ -Bestimmung mit $n_H = -1$ und Min = 0 % ; ^s: Signifikanter Unterschied des $pEC_{0,5diss}$ -Wertes von TD2 zu dem von W84 (ungepaarter t-Test). Angegeben sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten oder der Mittelwert mit den zugrundeliegenden Einzelwerten aus zwei unabhängigen Experimenten.

Beide in Abbildung 3.4 gezeigten Konzentrations-Effekt-Kurven in einander hinsichtlich ihrer Steilheit und der Lage des unteren Plateaus sehr ähnlich. Die kurvenbeschreibenden Kenngrößen n_H und Min weichen jeweils nicht von der angenommenen Parameter-Größe -1 bzw. 0 % ab.

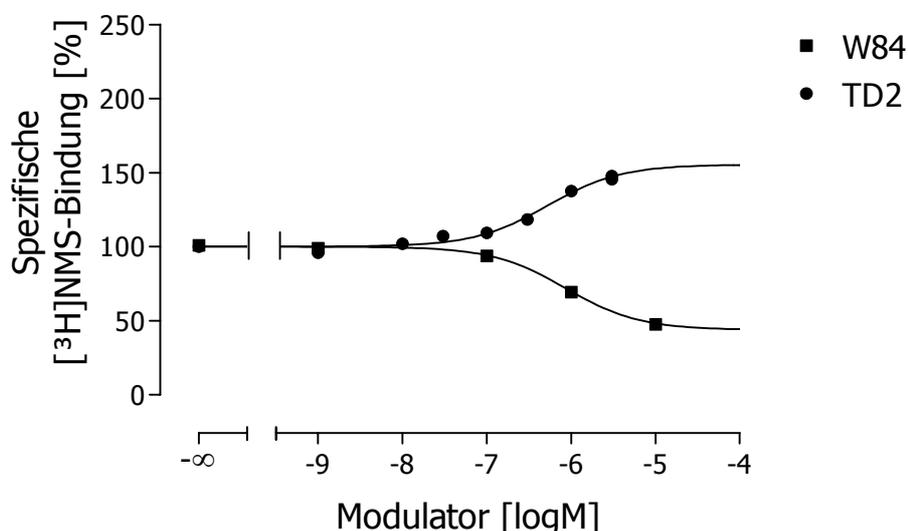


Abbildung 3.5: Konzentrations-Effekt-Kurven von W84 und TD2 zur Illustration ihres Einflusses auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3H]NMS$ an M_2 -Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C. *Ordinate:* Spezifische $[^3H]NMS$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Angegeben sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten.

Untersucher Modulator	pK _A	pα	B _{f p} [%]	p(αK _A) - pEC _{0,5diss}
W84	6,17 ± 0,02	-0,46 ± 0,01	14,1	-0,28
TD2	6,18 ± 0,01 ^{ns, p=0,68}	0,30 ± 0,02 ^{s, p<0,01}	42,9	-0,25

Tabelle 3.4: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.5 sowie der pEC_{0,5diss}-Werte aus Tabelle 3.3 ermittelte Parameter. B_{f p}: Fraktionelle Rezeptorbesetzung mit [³H]NMS im Plateaubereich der Kurve bei hohen Modulator-Konzentrationen; ^{s/ns}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied der betreffenden Kenngröße von TD2 zu derjenigen von W84 (ungepaarter t-Test). Für pK_A und pα sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten angegeben.

In den letzten Jahren wurden wiederholt Befunde von Radioligand-Bindungsstudien mit W84 und TD2 an M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C veröffentlicht, weshalb sich ein statistischer Vergleich mit diesen Daten anbietet (siehe Tabellen 3.5 bis 3.8).

Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Affinitäten von W84 und TD2 zu [³H]NMS-besetzten Rezeptoren stehen in Einklang mit den Befunden anderer Autoren. Ein Vergleich mit diesen ergibt lediglich marginale Differenzen, die in keinem Fall das Niveau der statistischen Signifikanz erreichen.

Bezüglich der Affinität zu freien Rezeptoren sowie der Kooperativität mit [³H]NMS finden sich zumeist gute Übereinstimmungen. Der signifikante Unterschied zwischen dem pK_A-Wert von W84 dieser Arbeit und demjenigen von Raasch (2003) (siehe Tabelle 3.7) kann nicht auf eine unterschiedliche Zersetzungsrate von W84 während der Inkubationszeit zurückgeführt werden, da dieser Zeitraum bei beiden Arbeiten identisch war. Möglicherweise ist für diese signifikante Affinitäts-Differenz die Tatsache verantwortlich, dass der Inkubationspuffer bei Raasch im Vergleich zu allen anderen Arbeiten, einschließlich dieser Dissertationsschrift, eine etwa um 10 % verminderte Ionenstärke aufwies; anstatt 3 mM MgHPO₄ x 3 H₂O enthielt er 2,6 mM und anstatt 50 mM Tris-HCl waren es nur 45 mM.

Zusätzlich ergibt sich eine signifikante Differenz zwischen dem pα-Wert von TD2 dieser Arbeit und derjenigen von Duda-Johner (2002) (siehe Tabelle 3.8).

Literaturquelle	pEC _{0,5diss} (W84)	Versuchszahl
Diese Arbeit	5,99 ± 0,07	3
Mohr (2004)	5,87 ± 0,08 ^{ns, p=0,32}	3
Muth et al. (2003)	5,87 ± 0,06 ^{ns, p=0,25}	4
Raasch (2003)	6,00 ± 0,07 ^{ns, p=0,92}	3
Daiss et al. (2002)	6,00 ± 0,06 ^{ns, p=0,92}	3
Duda-Johner (2002)	6,08 ± 0,07 ^{ns, p=0,45}	6
Botero Cid et al. (2000)	5,85 ± 0,05 ^{ns, p=0,18}	n. ang.
Nassif-Makki et al. (1999)	5,85 ± 0,06 ^{ns, p=0,18}	n. ang.

Tabelle 3.5: Gegenüberstellung der im Zuge dieser Arbeit ermittelten Affinität pEC_{0,5diss} von W84 zu [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C mit den Befunden anderer Autoren. n. ang.: In der entsprechenden Literaturquelle wurden keine Angaben zu der Zahl unabhängiger Versuche gemacht. Angegeben sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler.

Literaturquelle	pEC _{0,5diss} (TD2)	Versuchszahl
Diese Arbeit	6,73 (6,70; 6,77)	2
Daiss et al. (2002)	6,72 ± 0,08 ^{ns, p=0,92}	3
Duda-Johner (2002)	6,72 ± 0,06 ^{ns, p=0,92}	6

Tabelle 3.6: Gegenüberstellung der im Zuge dieser Arbeit ermittelten Affinität pEC_{0,5diss} von TD2 zu [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C mit den Befunden anderer Autoren. ^{ns}: Nicht signifikanter Unterschied des betreffenden pEC_{0,5diss}-Wertes zu demjenigen dieser Arbeit. Angegeben sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler oder der Mittelwert mit den zugrundeliegenden Einzelwerten.

Literatur-Quelle	pK _A (W84)	pα (W84)	Versuchszahl
Diese Arbeit	6,17 ± 0,02	-0,46 ± 0,01	3
Mohr (2004)	6,43 ± 0,16 ^{ns, p=0,25(W)}	-0,45 ± 0,04 ^{ns, p=0,82}	3
Muth et al. (2003)	6,19 ± 0,13 ^{ns, p=0,89(W)}	-0,47 ± 0,06 ^{ns, p=0,88(W)}	4
Raasch (2003)	6,53 ± 0,02 ^{s, p<0,01}	-0,48 ± 0,02 ^{ns, p=0,42}	3
Daiss et al. (2002)	6,41 ± 0,18 ^{ns, p=0,41(W)}	-0,53 ± 0,17 ^{ns, p=0,75(W)}	2
Duda-Johner (2002)	6,43 ± 0,26 ^{ns, p=0,42(W)}	-0,51 ± 0,02 ^{ns, p=0,09}	3

Tabelle 3.7: Gegenüberstellung der im Zuge dieser Arbeit ermittelten Affinität pK_A von W84 zu freien M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens sowie des Kooperativitätsfaktors pα mit [³H]NMS in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C mit den Befunden anderer Autoren. ^{s/ns}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied des betreffenden Parameterwertes zu demjenigen dieser Arbeit (ungepaarter t-Test, für den Fall statistisch ungleicher Standardfehler wurde eine Korrektur nach Welch (W) hinzugenommen). Angegeben sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler.

Literatur-Quelle	pK _A (TD2)	pα (TD2)	Versuchszahl
Diese Arbeit	6,18 ± 0,01	0,30 ± 0,02	3
Daiss et al. (2002)	6,46 ± 0,14 ^{ns, p=0,14(W)}	0,36 ± 0,03 ^{ns, p=0,19}	4
Duda-Johner (2002)	6,40 ± 0,14 ^{ns, p=0,26(W)}	0,46 ± 0,04 ^{s, p=0,02}	3

Tabelle 3.8: Gegenüberstellung der im Zuge dieser Arbeit ermittelten Affinität pK_a von TD2 zu freien M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens sowie des Kooperativitätsfaktors pα mit [³H]NMS in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C mit den Befunden anderer Autoren. ^{s/ns}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied des betreffenden Parameterwertes zu demjenigen dieser Arbeit (ungepaarter t-Test, für den Fall statistisch ungleicher Standardfehler wurde eine Korrektur nach Welch (W) hinzugenommen). Angegeben sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler.

W84 und TD2 weisen einen identischen pK_A-Wert auf, die pEC_{0,5diss}-Werte unterscheiden sich hingegen deutlich voneinander. Im Vergleich zu W84 ist die Konzentrations-Effekt-Kurve von TD2 für die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung gekennzeichnet durch eine Parallelverschiebung um etwa eine dreiviertel Dekade in den Bereich höherer Affinität zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor. Diese signifikante Differenz zwischen den pEC_{0,5diss}-Werten ist für die gegenläufige Beeinflussung der [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung verantwortlich. Die Affinität von W84 zu NMS-besetzten Rezeptoren ist kleiner als diejenige zu freien Rezeptoren, weshalb sich W84 negativ kooperativ verhält. Bei TD2 ist das Affinitätsverhältnis entgegengesetzt, dieser Modulator ist daher durch eine positive Kooperativität gekennzeichnet. Der Austausch eines quartären Stickstoffes in W84 gegen ein Silizium-Atom in TD2 reicht somit für eine Kooperativitätsumkehr aus.

3.2.2 Methylphthalimid-substituierte Silizium-haltige Modulatoren

Ausgehend von TD2, der Stammverbindung aller Silizium-haltigen Verbindungen, wurden die Auswirkungen verschiedener Strukturmodifikationen auf die allosterischen Eigenschaften untersucht. Die geringste Form der Variation war eine Methylierung, wie sie von Daiss auch an Position 5 der lateralen aromatischen Systeme vorgenommen wurde. Dies betraf entweder die Ammonium-Seite (TD12), die Silizium-Seite (TD21) oder beide Molekül-Seiten zugleich (TD17).

Über die Beeinflussung der [^3H]NMS-Dissoziation durch diese Modulatoren gibt Abbildung 3.6 in Verbindung mit Tabelle 3.9 Auskunft. In Abbildung 3.7 und Tabelle 3.10 sind die Affinitäten zu freien Rezeptoren sowie deren Kooperativität mit dem Radioliganden [^3H]NMS dargestellt.

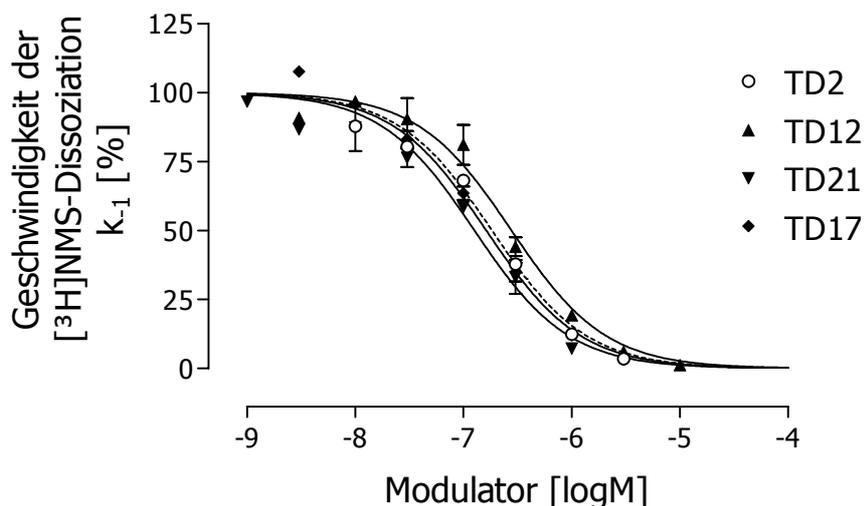


Abbildung 3.6: Konzentrations-Effekt-Kurven von TD12, TD21 und TD17 zur Illustration ihres Einflusses auf die Geschwindigkeit der [^3H]NMS-Dissoziation an M_2 -Rezeptoren des Hausschweinerzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C. Die Ausgangsverbindung TD2 ist zum Zweck des Vergleiches mit aufgeführt. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante k_{-1} der [^3H]NMS-Dissoziation in Prozent bezogen auf die Kontrolle in Abwesenheit des Modulators; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus zwei bis vier unabhängigen Experimenten.

Untersucher Modulator	$pEC_{0,5diss}$	n_H	Min [%]
TD2	6,73 (6,70; 6,77)	-0,99 (-0,99 ^{ns} ; -0,99 ^{ns})	-3,3 (-3,5 ^{ns} ; -3,2 ^{ns})
TD12	6,56 \pm 0,06 ^{ns2, p=0,14}	-1,19 \pm 0,05 ^{ns}	-4,7 \pm 6,3 ^{ns}
TD21	6,90 \pm 0,06 ^{ns2, p=0,14}	-0,86 \pm 0,06 ^{ns}	0,1 \pm 8,2 ^{ns}
TD17	6,79 \pm 0,03 ^{ns2, p=0,31}	-1,05 \pm 0,08 ^{ns}	-3,0 \pm 3,6 ^{ns}

Tabelle 3.9: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.6 ermittelte Parameter. ^{ns}: Nicht signifikanter Unterschied der Kurvensteilheit n_H zu -1 bzw. des unteren Kurvenplateaus Min zu 0 % (F-Test); ^{ns2}: Nicht signifikanter Unterschied des betreffenden $pEC_{0,5diss}$ -Wertes zu demjenigen von TD2 (ungepaarter t-Test). Angegeben sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten oder der Mittelwert mit den zugehörigen Einzelwerten aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die allosterischen Modulatoren TD12, TD17 und TD21 gehen, wie auch TD2, vermutlich eine einfache, dem Massenwirkungsgesetz gehorchende Interaktion mit Antagonist-besetzten Rezeptoren ein, da bei ihnen weder eine ungewöhnliche Steilheit der Konzentrations-Effekt-Kurve noch ein signifikant erhöhtes unteres Kurvenplateau festgestellt werden kann. Die verschiedenen Kurven unterscheiden sich lediglich durch eine Parallelverschiebung.

Eine ein- oder beidseitige Methylierung der lateralen Phthalimid-Ringe bewirkt nur geringfügige, statistisch nicht signifikante Veränderungen der Affinität zu besetzten Rezeptoren, die allerdings systematisch zu sein scheinen. Durch die Methylierung des endständigen aromatischen Systems auf der Silizium-Seite (TD21) lässt sich vermutlich ein leichter Affinitäts-Gewinn erzielen, einen Affinitäts-Verlust ähnlicher Größenordnung bewirkt offenbar die Einführung einer Methyl-Gruppe auf der gegenüberliegenden Ammonium-Seite (TD12). Werden beide Modifikationen zugleich vorgenommen, heben sich die Effekte anscheinend auf, denn der pEC_{0,5diss}-Wert von TD17 entspricht recht genau demjenigen von TD2.

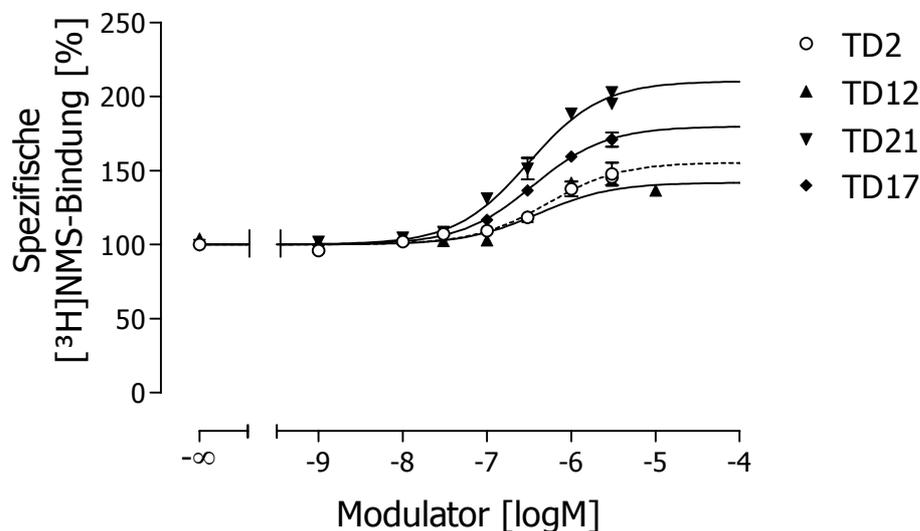


Abbildung 3.7: Konzentrations-Effekt-Kurven von TD12, TD21 und TD17 zur Illustration ihres Einflusses auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS an M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C. Die Ausgangsverbindung TD2 ist zum Zweck des Vergleiches mit aufgeführt. *Ordinate:* Spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Angegeben sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus drei bis vier unabhängigen Experimenten.

Untersuchter Modulator	pK _A	p α	B _{f p} [%]	p(α K _A) - pEC _{0,5diss}
TD2	6,18 ± 0,01	0,30 ± 0,02	42,9	-0,25
TD12	6,30 ± 0,11 ^{ns2, p=0,38(W)}	0,24 ± 0,02 ^{ns2, p=0,12}	44,8	-0,02
TD21	6,30 ± 0,10 ^{ns2, p=0,31(W)}	0,53 ± 0,02 ^{s2, p<0,01}	54,1	-0,07
TD17	6,28 ± 0,04 ^{ns2, p=0,08(W)}	0,43 ± 0,02 ^{s2, p<0,01}	52,1	-0,08

Tabelle 3.10: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.7 sowie der pEC_{0,5diss}-Werte aus Tabelle 3.9 ermittelte Parameter. B_{f p}: Fraktionelle Rezeptorbesetzung mit [³H]NMS im Plateaubereich der Kurve bei hohen Modulator-Konzentrationen; ^{s2/ns2}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied der betreffenden Kenngröße zu derjenigen von TD2 (ungepaarter t-Test, für den Fall statistisch ungleicher Standardfehler wurde eine Korrektur nach Welch (W) hinzugenommen). Für pK_A und p α sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus drei bis vier unabhängigen Experimenten angegeben.

Die Affinität zu freien Rezeptoren wird durch die verschiedenen Formen der endständigen Methylierung nicht signifikant verändert.

Wie die Ausgangsverbindung TD2 weisen alle lateral mono- und dimethylierten Substanzen eine ausgeprägte Bindungsförderung auf, die zum Teil signifikant von TD2 abweicht. Bei genauerer Betrachtung lässt sich in Abhängigkeit der Position der Methylierung ein Muster für die Veränderung des p α -Wertes erkennen. Im Vergleich zu TD2 scheint eine Methylierung der Ammonium-Seite (TD12) das Ausmaß der positiven Kooperativität zu vermindern, auch wenn der Unterschied nicht signifikant ist. Demgegenüber erhöht die analoge Strukturvariation auf der Silizium-Seite (TD21) die Kooperativität signifikant. Der p α -Wert der beidseitig methylierten Verbindung TD17 ist ebenfalls signifikant höher als derjenige von TD2.

3.2.3 Zwischenketten-methylierte Silizium-haltige Modulatoren

Mit TD23 und TD24 wurden zwei weitere monomethylierte Verbindungen untersucht. In TD23 befindet sich die zusätzliche Methylgruppe am mittleren Kohlenstoff-Atom der Propyl-Zwischenkette auf der Ammonium-Seite des Moleküls, in TD24 wurde die analoge Position auf der Silizium-Seite substituiert. Bedingt durch diese Variation entstanden jeweils optisch aktive Verbindungen, die als Racemate zum Einsatz kamen (siehe 2.5.2.1).

Die gefundenen Einflüsse von TD23 und TD24 auf die [³H]NMS-Dissoziation sind in Abbildung 3.8 sowie in Tabelle 3.11 zusammengefasst, die Wirkungen auf die Radioligand-Gleichgewichtsbindung sind in Abbildung 3.9 sowie Tabelle 3.12 gezeigt.

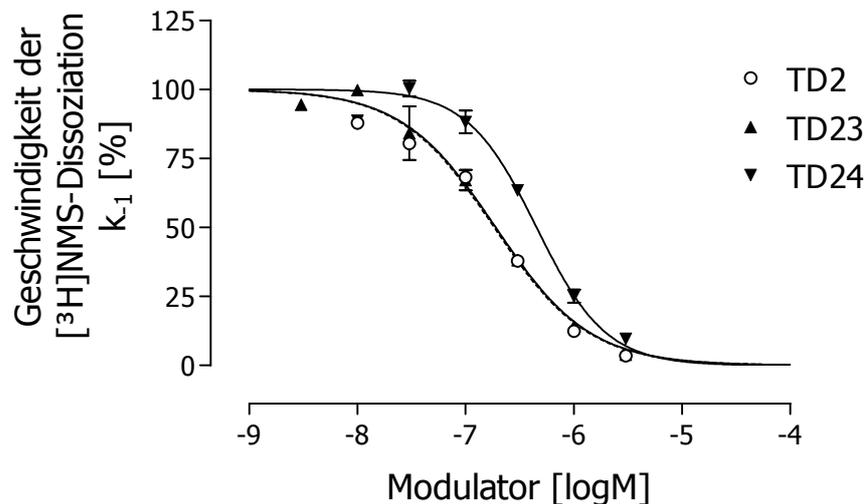


Abbildung 3.8: Konzentrations-Effekt-Kurven von TD23 und TD24 zur Illustration ihres Einflusses auf die Geschwindigkeit der [³H]NMS-Dissoziation an M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C. Die Ausgangsverbindung TD2 ist zum Zweck des Vergleiches mit aufgeführt. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante k_{-1} der [³H]NMS-Dissoziation in Prozent bezogen auf die Kontrolle in Abwesenheit des Modulators; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus zwei bis vier unabhängigen Experimenten.

Untersucher Modulator	pEC _{0,5diss}	n _H	Min [%]
TD2	6,73 (6,70; 6,77)	-0,99 (-0,99 ^{ns} ; -0,99 ^{ns})	-3,3 (-3,5 ^{ns} ; -3,2 ^{ns})
TD23	6,72 \pm 0,05 ^{ns2} , p=0,88	-1,03 \pm 0,13 ^{ns}	-2,9 \pm 6,8 ^{ns}
TD24	6,34 \pm 0,03 ^{s2} , p<0,01	-1,36 \pm 0,13 ^s	4,2 \pm 8,8 ^{ns}

Tabelle 3.11: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.8 ermittelte Parameter. ^{s/ns}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied der Kurvensteilheit n_H zu -1 bzw. des unteren Kurvenplateaus Min zu 0 % (F-Test); ^{s/ns2}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied des betreffenden pEC_{0,5diss}-Wertes zu demjenigen von TD2 (ungepaarter t-Test). Angegeben sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten oder der Mittelwert mit den zugrundeliegenden Einzelwerten aus zwei unabhängigen Experimenten.

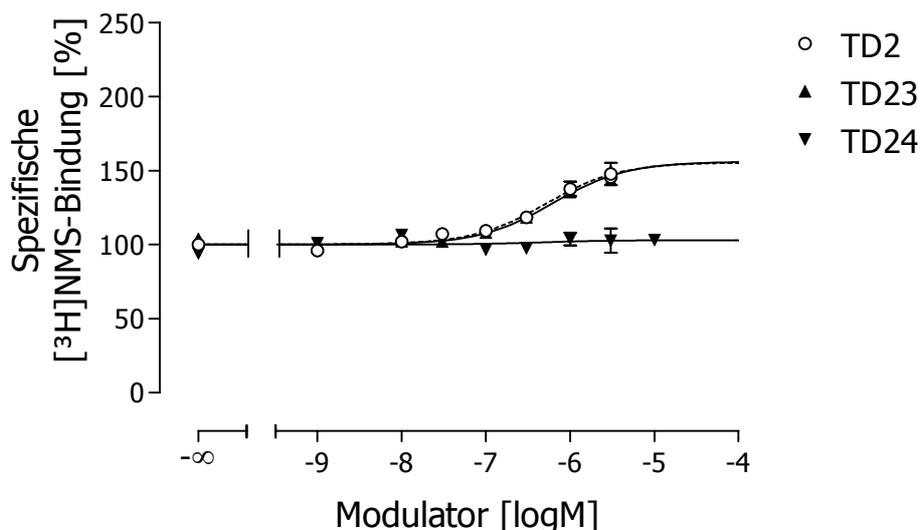


Abbildung 3.9: Konzentrations-Effekt-Kurven von TD23 und TD24 zur Illustration ihres Einflusses auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ an M_2 -Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C. Die Ausgangsverbindung TD2 ist zum Zweck des Vergleiches mit aufgeführt. *Ordinate:* Spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Angegeben sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten.

Untersucher Modulator	pK_A	$\text{p}\alpha$	$\text{B}_f \text{P}$ [%]	$\text{p}(\alpha\text{K}_A) -$ $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$
TD2	$6,18 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,02$	42,9	-0,25
TD23	$6,11 \pm 0,07^{\text{ns2}, \text{p}=0,47(\text{W})}$	$0,28 \pm 0,02^{\text{ns2}, \text{p}=0,67}$	38,7	-0,33
TD24	$6,33 \pm 0,03^{\text{s2}, \text{p}<0,01}$	$0,01 \pm 0,03^{\text{s2}, \text{p}<0,01}$	26,6	0,00

Tabelle 3.12: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.9 sowie der $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$ -Werte aus Tabelle 3.11 ermittelte Parameter. Aufgrund der neutralen Kooperativität erfolgte die pK_A -Bestimmung von TD24 anhand des Zusammenhanges $\text{K}_A = \text{EC}_{0,5\text{diss}}/\alpha$ (siehe 2.3.1.3). $\text{B}_f \text{P}$: Fraktionelle Rezeptorbesetzung mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ im Plateaubereich der Kurve bei hohen Modulator-Konzentrationen; $^{\text{s2}/\text{ns2}}$: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied der betreffenden Kenngröße zu derjenigen von TD2 (ungepaarter t-Test, für den Fall statistisch ungleicher Standardfehler wurde eine Korrektur nach Welch (W) hinzugenommen). Für pK_A und $\text{p}\alpha$ sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten angegeben.

Das Bindungsverhalten von TD23 an $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten Rezeptoren scheint aufgrund der normalen Kurvensteilheit dem Massenwirkungsgesetz zu gehorchen. Im Gegensatz dazu weicht das Steigungsmaß der TD24-Kurve signifikant von -1 ab, so dass dieser Modulator vermutlich in komplexer Art mit dem Rezeptorprotein interagiert.

Sämtliche Modulator-Eigenschaften der auf der Ammonium-Seite methylierten Verbindung TD23 entsprechen denen von TD2. Sowohl die Affinitäten zu besetzten als auch die zu freien Rezeptoren differieren um weniger als 0,1 Dekaden, weshalb beide Verbindungen eine gleich stark ausgeprägte positive Kooperativität aufweisen.

In Vergleich dazu ergeben sich bei TD24 deutliche Unterschiede. Gegenüber TD2 ist der pEC_{0,5diss}-Wert signifikant um annähernd 0,4 Dekaden erniedrigt und der pK_A-Wert ist signifikant um rund 0,15 Dekaden erhöht. Die [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung wird durch TD24 nicht verändert, der Modulator verhält sich neutral kooperativ. Bei dieser Art von Kooperativität ist $\alpha = 1$ und aus dem Zusammenhang „ $\alpha \cdot K_A = EC_{0,5diss}$ “ ergibt sich daher „ $K_A = EC_{0,5diss}$ “. Dieser Modulator besitzt also eine identische Affinität zu Antagonist-besetzten wie zu freien Rezeptoren.

Bei der Betrachtung der experimentellen Ergebnisse von TD23 und TD24 ist zu berücksichtigen, dass es sich bei beiden um optisch aktive Verbindungen handelt, die als Racemat zum Einsatz kamen. Es ist denkbar, dass sich die jeweiligen Enantiomere in ihren Wirkungen unterscheiden.

3.2.4 Naphthalimid-substituierte Silizium-haltige Modulatoren

Im Zuge schrittweiser Veränderungen des TD2-Grundkörpers wurden auch Verbindungen untersucht, bei welchen die laterale Modifikation über die Größe einer Methylierung hinaus ging. Dabei wurde von Daiss (2004) die Phthalimid-Gruppe gegen einen Naphthalimid-Substituenten ausgetauscht, was wiederum auf der Ammonium-Seite (TD15), auf der Silizium-Seite (TD16) oder auf beiden Molekülseiten (TD14) durchgeführt wurde.

Die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Substanzen können den Abbildungen 3.10 und 3.11 sowie den Tabellen 3.13 und 3.14 entnommen werden.

Die Konzentrations-Effekt-Kurven für die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung aller ein- oder beidseitig Naphthalimid-substituierten Verbindungen sind charakterisiert durch ein unteres Plateau, welches dem Wert Min = 0 % entspricht. Ungeachtet einer möglichen Veränderung des endständigen Aromaten der Ammonium-Hälfte bewirkt die Einführung einer Naphthalimid-Gruppe auf der Silizium-Seite eine sig-

nifikante Zunahme der Kurvensteilheit, weshalb im Gegensatz zu TD15 für TD14 und TD16 ein komplexes Bindungsverhalten wahrscheinlich erscheint.

Die im Vergleich zu TD2 vorgenommene strukturelle Modifikation wirkt sich deutlich auf das Volumen des lateralen Substituenten aus, eine signifikante Veränderung der Affinität zu [^3H]NMS-besetzten Rezeptoren zieht dies jedoch nicht nach sich. Dennoch scheinen die Veränderungen regelhaft zu sein. Erfolgt die Vergrößerung auf der Ammonium-Seite (TD15), so scheint sich der Wendepunkt der Konzentrations-Effekt-Kurve um rund 0,2 Dekaden in Richtung des niederaffinen Bereiches zu verschieben, andernfalls (TD16) wird anscheinend ein Affinitäts-Gewinn von etwa 0,1 Dekaden erzielt. Für den Fall einer symmetrischen Modifikation des Modulator-Moleküls addieren sich beide Veränderungen recht genau, die Affinität von TD14 zu Antagonist-besetzten Rezeptoren scheint im Vergleich zu TD2 um etwa 0,1 Dekaden abgenommen zu haben. Für die gemessenen Affinitäts-Veränderungen deutet sich demnach eine Abhängigkeit von der derivatisierten Molekülhälfte an, wofür auch der signifikante Unterschied zwischen den $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$ -Werten von TD15 und TD16 ($p < 0,01$; ungepaarter t-Test) spricht.

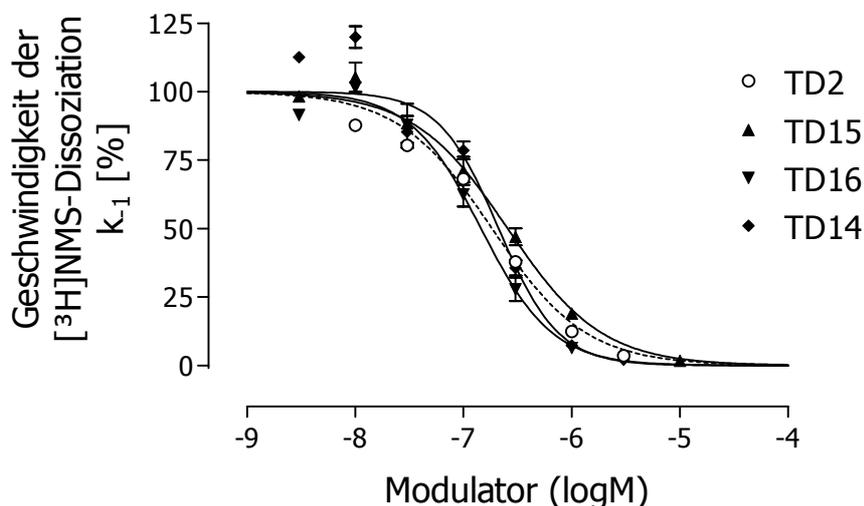


Abbildung 3.10: Konzentrations-Effekt-Kurven von TD15, TD16 und TD14 zur Illustration ihres Einflusses auf die Geschwindigkeit der [^3H]NMS-Dissoziation an M_2 -Rezeptoren des Hausschweinerzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C. Die Ausgangsverbindung TD2 ist zum Zweck des Vergleiches mit aufgeführt. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante k_{-1} der [^3H]NMS-Dissoziation in Prozent bezogen auf die Kontrolle in Abwesenheit des Modulators; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus zwei bis fünf unabhängigen Experimenten.

3.2 Beeinflussung der [³H]NMS-Dissoziation sowie der [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung an M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens

Untersucher Modulator	pEC _{0,5diss}	n _H	Min [%]
TD2	6,73 (6,70; 6,77)	-0,99 (-0,99 ^{ns} ; -0,99 ^{ns})	-3,3 (-3,5 ^{ns} ; -3,2 ^{ns})
TD15	6,59 ± 0,05 ^{ns2, p=0,16}	-1,03 ± 0,13 ^{ns}	-1,5 ± 7,0 ^{ns}
TD16	6,84 ± 0,03 ^{ns2, p=0,09}	-1,32 ± 0,11 ^s	-1,0 ± 4,9 ^{ns}
TD14	6,67 ± 0,06 ^{ns2, p=0,54}	-1,57 ± 0,30 ^s	-0,7 ± 10,4 ^{ns}

Tabelle 3.13: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.10 ermittelte Parameter. ^{s/ns}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied der Kurvensteilheit n_H zu -1 bzw. des unteren Kurvenplateaus Min zu 0 % (F-Test); ^{ns2}: Nicht signifikanter Unterschied des betreffenden pEC_{0,5diss}-Wertes zu demjenigen von TD2 (ungepaarter t-Test). Angegeben sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus vier bis fünf unabhängigen Experimenten oder der Mittelwert mit den zugrundeliegenden Einzelwerten aus zwei unabhängigen Experimenten.

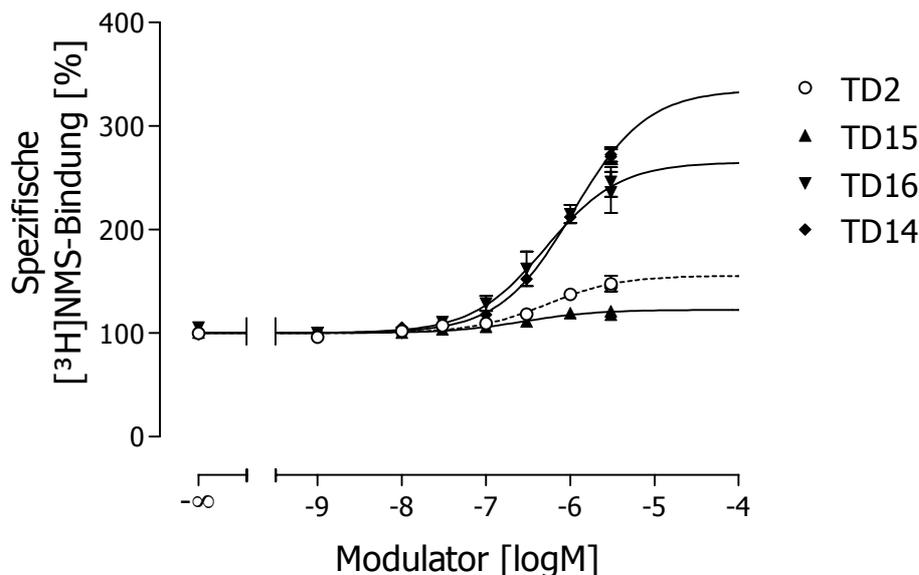


Abbildung 3.11: Konzentrations-Effekt-Kurven von TD15, TD16 und TD14 zur Illustration ihres Einflusses auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS an M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C. Die Ausgangsverbindung TD2 ist zum Zweck des Vergleiches mit aufgeführt. *Ordinate*: Spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz; *Abszisse*: dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Angegeben sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten.

Untersucher Modulator	pK _A	pα	B _{f p} [%]	p(αK _A) - pEC _{0,5diss}
TD2	6,18 ± 0,01	0,30 ± 0,02	42,9	-0,25
TD15	6,51 ± 0,07 ^{s2, p=0,04(W)}	0,13 ± 0,01 ^{s2, p<0,01}	35,8	0,05
TD16	5,81 ± 0,11 ^{ns2, p=0,08(W)}	0,91 ± 0,12 ^{s2, p=0,04(W)}	76,8	-0,12
TD14	4,62 ± 0,40 ^{ns2, p=0,06(W)}	1,87 ± 0,37 ^{ns2, p>0,05(W)}	97,4	-0,18

Tabelle 3.14: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.11 sowie der pEC_{0,5diss}-Werte aus Tabelle 3.13 ermittelte Parameter. B_{f p}: Fraktionelle Rezeptorbesetzung mit [³H]NMS im Plateaubereich der Kurve bei hohen Modulator-Konzentrationen; ^{s2/ns2}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied der betreffenden Kenngröße zu derjenigen von TD2 (ungepaarter t-Test, für den Fall statistisch ungleicher Standardfehler wurde eine Korrektur nach Welch (W) hinzugenommen). Für pK_A und pα sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten angegeben.

Die Substitution der Phthalimid-Gruppen durch Naphthalimid-Reste beeinflusst den Effekt auf die [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung deutlich (pα in Tabelle 3.14). Die Modifikation an der Ammonium-Seite (TD15) des Moleküls bewirkt eine signifikante Erhöhung des pK_A-Wertes von etwa 0,3 Dekaden. Aufgrund dieser Veränderung sowie der im Vergleich zu TD2 geringfügigen Abnahme der Affinität zum Antagonist-besetzten Rezeptor (pEC_{0,5diss} in Tabelle 3.13) schwächt sich die positive Kooperativität etwas ab. Wesentlich stärker wird die Kooperativität durch die analoge Variation auf der gegenüberliegenden Silizium-Seite (TD16) verändert. Der pK_A-Wert dieses Modulators scheint um annähernd 0,4 Dekaden abzunehmen, was vor dem Hintergrund eines nahezu unveränderten pEC_{0,5diss}-Wertes die Steigerung der positiven Kooperativität erklärt. Eine starke Bindungsförderung kennzeichnet auch TD14, wo beide lateralen aromatischen Systeme vergrößert sind. Aufgrund einer recht großen Streuung unterscheidet sich der pα-Wert dieses Modulators jedoch nicht signifikant von demjenigen von TD2.

Aufgrund der starken positiven Kooperativität von TD14 wird dessen Konzentrations-Effekt-Kurve in Abbildung 3.11 zum überwiegenden Teil von der Modulator-Affinität zu [³H]NMS-besetzten Rezeptoren bestimmt, was die Ableitung der Affinität zu freien Rezeptoren stark erschwert. Die Angabe des pK_A-Wertes ist deshalb nur mit großer Streuung und geringer Sicherheit möglich (siehe Tabelle 3.14).

Mit dem Ziel einer genaueren Bestimmung der Affinität von TD14 zu freien Rezeptoren wurden heterologe Interaktionsstudien mit dem Muskarin-Rezeptor-

Agonisten [³H]OxoM durchgeführt, wie sie in 2.3.2.1.2 beschrieben wurden. Zwischen diesem Radioliganden und den Silizium-haltigen Verbindungen können sich offenbar kaum ternäre Komplexe ausbilden (Großmüller, 2003), so dass die Bestimmung der Affinität zu freien Rezeptoren nicht durch die Anlagerung von TD14 an OxoM-besetzte Rezeptoren erschwert wird. Unter der Vorstellung, dass die Besetzung der allosterischen Bindungsstelle an Orthoster-freien Rezeptoren die Assoziation von orthosterischen Agonisten und Antagonisten gleichermaßen hemmt, sollte die Affinität des Allostere zum freien Rezeptor auch mit einem Radioagonisten wie [³H]OxoM erfassbar sein.

In diese Untersuchungsreihe wurden neben TD14 die strukturverwandten Verbindungen TD15 und TD16 eingeschlossen. TD2 wurde zusätzlich als Kontrollsubstanz zu Überprüfung der Methodik verwendet, da der mit [³H]NMS bestimmte pK_A-Wert von TD2 aufgrund der nicht allzu ausgeprägten positiven Kooperativität zwischen diesen beiden Liganden plausibel erscheint. Da die eingesetzten Reaktionspartner vermutlich keine ternären Komplexe eingehen, war eine Datenanalyse des allosterischen Modells nicht möglich. Es wurde statt dessen die Hill-Gleichung 2.9 verwendet. Abbildung 3.12 sowie Tabelle 3.15 veranschaulichen die Resultate dieser Experimente.

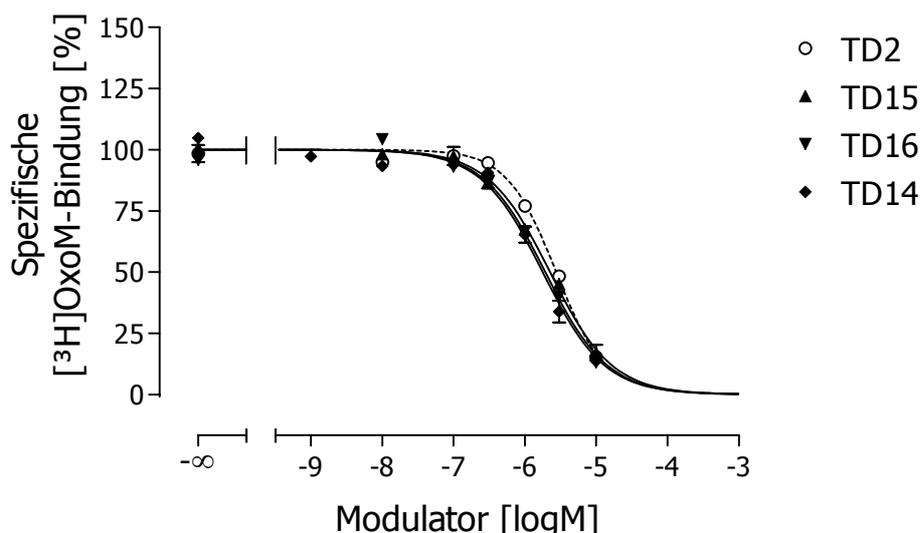


Abbildung 3.12: Konzentrations-Effekt-Kurven von TD2, TD15, TD16 und TD14 zur Illustration ihres Einflusses auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]OxoM an M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C. *Ordinate:* Spezifische [³H]OxoM-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Angegeben sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus drei bis vier unabhängigen Experimenten.

Untersuchter Modulator	pK _A	n _H	Min [%]
TD2	5,56 ± 0,03	-1,25 ± 0,09 ^s	-7,8 ± 12,0 ^{ns}
TD15	5,65 ± 0,03 ^{s2, p<0,05}	-0,98 ± 0,05 ^{ns}	-0,5 ± 3,8 ^{ns}
TD16	5,71 ± 0,04 ^{s2, p=0,04}	-1,04 ± 0,10 ^{ns}	-5,2 ± 6,6 ^{ns}
TD14	5,75 ± 0,03 ^{s2, p=0,01}	-1,11 ± 0,09 ^{ns}	-4,5 ± 4,9 ^{ns}

Tabelle 3.15: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.12 ermittelte Parameter. ^{s/ns}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied der Kurvensteilheit n_H zu -1 bzw. des unteren Kurvenplateaus Min zu 0 % (F-Test); ^{s2}: Signifikanter Unterschied des betreffenden pK_A-Wertes zu demjenigen von TD2 (ungepaarter t-Test). Angegeben sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus drei bis vier unabhängigen Experimenten.

Die spezifische Gleichgewichtsbindung von [³H]OxoM lässt sich unter Verwendung hoher Modulator-Konzentrationen vollständig aufheben, so dass sich für keine Konzentrations-Effekt-Kurve in Abbildung 3.12 eine signifikante Differenz des unteren Plateaus Min zum 0 %-Niveau feststellen lässt.

Die mittels [³H]OxoM bestimmte Affinität von TD2 zu freien Rezeptoren (pK_A = 5,56; siehe Tabelle 3.15) unterscheidet sich signifikant von derjenigen, die aus den Experimenten mit [³H]NMS resultierte (pK_A = 6,18; siehe Tabelle 3.14) (p < 0,01; ungepaarter t-Test). Dies entspricht nicht den Erwartungen (siehe oben), über die Ursachen dieses Phänomens kann nur spekuliert werden.

Die heterologen Interaktionsexperimente mit [³H]NMS haben gezeigt, dass TD14, TD15 und TD16 in deutlich unterschiedlichem Ausmaß die Radioligand-Bindung fördern (siehe Tabelle 3.14). Da die pEC_{0,5diss}-Werte dieser drei Modulatoren, die methodisch sicher bestimmt werden konnten, sehr ähnlich sind (siehe Tabelle 3.13), müssen die pK_A-Werte von TD14, TD15 und TD16 deutlich voneinander abweichen, um die Kooperativitäts-Unterschiede erklären zu können. Mit [³H]OxoM als Sonde ergaben sich für TD14, TD15 und TD16 jedoch identische Affinitäten zu freien Rezeptoren (siehe Tabelle 3.15).

Zusammenfassend ergibt sich, dass es durch den Austausch des Radioliganden offenbar nicht möglich ist, die mit [³H]NMS ermittelten Affinitäten der Siliziumhaltigen Verbindungen zu präzisieren. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die mit [³H]NMS erhobenen pK_A-Werte berücksichtigt.

3.2.5 Lateral-asymmetrisch vergrößerte Silizium-haltige Modulatoren

Zur Gewinnung tieferer Einblicke in die Auswirkungen lateraler struktureller Modifikationen von Silizium-haltigen Verbindungen wurden die in 3.2.2 und 3.2.4 vorgestellten Molekülveränderungen von Daiss (2004) nicht nur isoliert, sondern auch in Kombination miteinander vorgenommen. Für TD20 wurde der Phthalimid-Rest der Silizium-Seite an Position 5 methyliert und gleichzeitig derjenige der Ammonium-Seite gegen einen Naphthalimid-Substituenten ausgetauscht. Bei der verwandten Verbindung TD18 wurden diese Variationen gegenläufig vorgenommen.

Die Befunde, die mit diesen Modulatoren erzielt wurden, können den Abbildungen 3.13 und 3.14 sowie den Tabellen 3.16 und 3.17 entnommen werden.

Für beide lateral asymmetrisch vergrößerten Modulatoren kann eine Interaktion mit Antagonist-besetzten Rezeptoren angenommen werden, sie dem Massenwirkungsgesetz gehorcht. Weder das Steigungsmaß noch das Niveau des unteren Kurvenplateaus von TD18 und TD20 weicht signifikant vom jeweils angenommenen Parameterwert -1 bzw. 0 % ab.

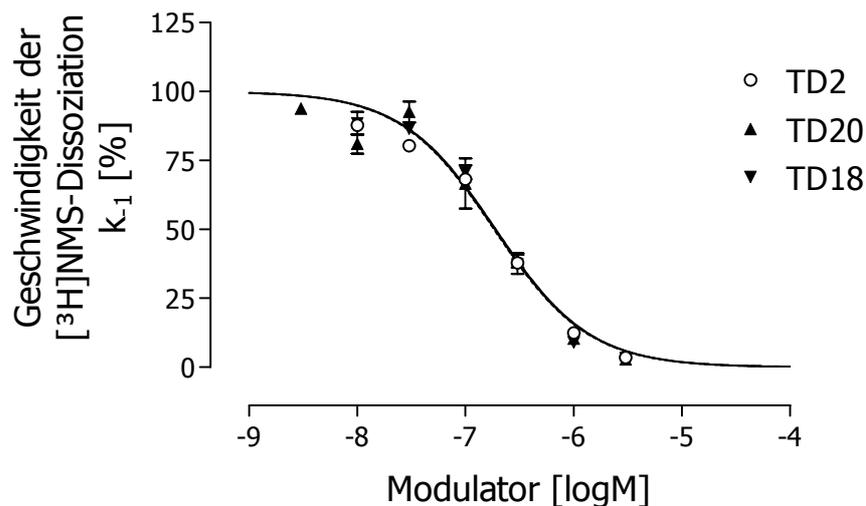


Abbildung 3.13: Konzentrations-Effekt-Kurven von TD20 und TD18 zur Illustration ihres Einflusses auf die Geschwindigkeit der [³H]NMS-Dissoziation an M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C. Die Ausgangsverbindung TD2 ist zum Zweck des Vergleiches mit aufgeführt. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante k₋₁ der [³H]NMS-Dissoziation in Prozent bezogen auf die Kontrolle in Abwesenheit des Modulators; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus zwei bis vier unabhängigen Experimenten.

Untersucher Modulator	$pEC_{0,5diss}$	n_H	Min [%]
TD2	6,73 (6,70; 6,77)	-0,99 (-0,99 ^{ns} ; -0,99 ^{ns})	-3,3 (-3,5 ^{ns} ; -3,2 ^{ns})
TD20	6,72 ± 0,07 ^{ns2, p=0,91}	-1,10 ± 0,19 ^{ns}	-7,3 ± 9,8 ^{ns}
TD18	6,73 ± 0,06 ^{ns2, p=0,28}	-1,17 ± 0,10 ^{ns}	0,9 ± 3,8 ^{ns}

Tabelle 3.16: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.13 ermittelte Parameter. ^{ns}: Nicht signifikanter Unterschied der Kurvensteilheit n_H zu -1 bzw. des unteren Kurvenplateaus Min zu 0 % (F-Test); ^{ns2}: Nicht signifikanter Unterschied des betreffenden $pEC_{0,5diss}$ -Wertes zu demjenigen von TD2 (ungepaarter t-Test). Angegeben sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten oder der Mittelwert mit den zugrundeliegenden Einzelwerten aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die strukturellen Modifikationen, die ausgehend von TD2 vorgenommen wurden, bewirken keinerlei Affinitäts-Veränderungen zu [³H]NMS-besetzten Rezeptoren, die Wendepunkte der Konzentrations-Effekt-Kurven von TD18 und TD20 sind identisch zu demjenigen der TD2-Kurve.

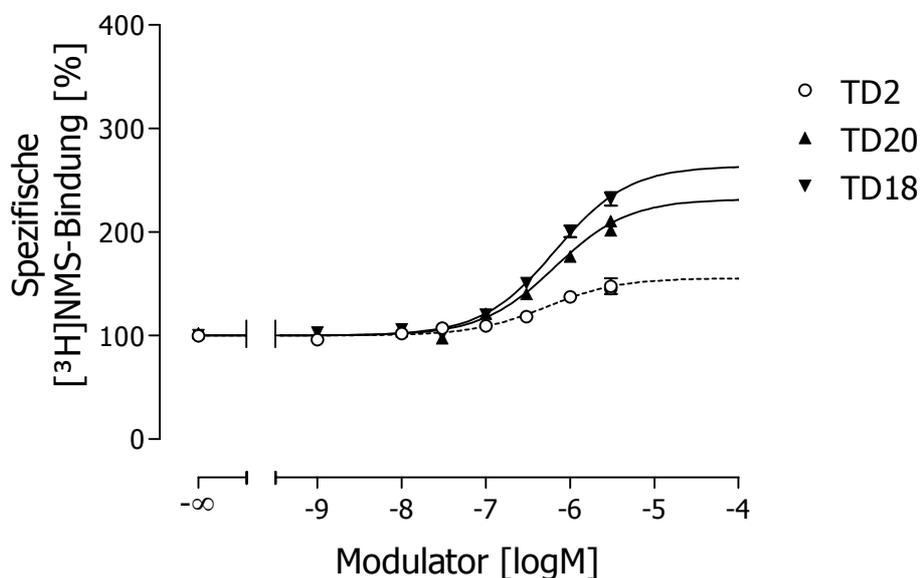


Abbildung 3.14: Konzentrations-Effekt-Kurven von TD20 und TD18 zur Illustration ihres Einflusses auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS an M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C. Die Ausgangsverbindung TD2 ist zum Zweck des Vergleiches mit aufgeführt. *Ordinate:* Spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Angegeben sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten.

Untersucher Modulator	pK _A	pα	B _{f p} [%]	p(αK _A) - pEC _{0,5diss}
TD2	6,18 ± 0,01	0,30 ± 0,02	42,9	-0,25
TD20	5,85 ± 0,16 ^{ns2, p=0,17(W)}	0,70 ± 0,10 ^{ns2, p=0,05(W)}	67,2	-0,17
TD18	5,70 ± 0,11 ^{s2, p<0,05(W)}	0,90 ± 0,06 ^{s2, p<0,01}	76,2	-0,13

Tabelle 3.17: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.14 sowie der pEC_{0,5diss}-Werte aus Tabelle 3.16 ermittelte Parameter. B_{f p}: Fraktionelle Rezeptorbesetzung mit [³H]NMS im Plateaubereich der Kurve bei hohen Modulator-Konzentrationen; ^{s2/ns2}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied der betreffenden Kenngröße zu derjenigen von TD2 (ungepaarter t-Test, für den Fall statistisch ungleicher Standardfehler wurde eine Korrektur nach Welch (W) hinzugenommen). Für pK_A und pα sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten angegeben.

Im Vergleich zur Ausgangsverbindung TD2 wird die [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung durch TD18 signifikant stärker angehoben. Da die Affinitäten beider Modulatoren zu Antagonist-besetzten Rezeptoren identisch sind, geht der höhere pα-Wert von TD18 vermutlich auf die Tatsache zurück, dass dieser Modulator gegenüber TD2 eine um rund 0,5 Dekaden signifikant verminderte Affinität zu freien Rezeptoren aufweist. Diese Zusammenhänge können auch für TD20 angenommen werden, auch wenn der Unterschied im Vergleich zu TD2 nicht signifikant ist. Diese Befunde lassen vermuten, dass die stärkere Vergrößerung des lateralen Substituenten der Silizium-Seite mit einer höheren positiven Kooperativität einhergeht.

3.2.6 Succinimid-substituierte Silizium-haltige Modulatoren

Als Ausgangsverbindung dieser Substanzen diente TD14, dessen Naphthalimid-Gruppen von Daiss (2004) schrittweise gegen eine nicht-aromatische Succinimid-Struktur ausgetauscht wurden. Eine einseitige Succinimid-Substitution der Ammonium-Seite ergab TD19, die gleichartige Veränderung auf der gegenüberliegenden Hälfte führte zu TD25 und die Entfernung beider aromatischer Systeme resultierte in TD22.

Die Beeinflussung der [³H]NMS-Dissoziation durch diese Verbindungen ist in Abbildung 3.15 und Tabelle 3.18 zusammengefasst, die Auswirkungen auf die Radioligand-Gleichgewichtsbindung zeigt Abbildung 3.16 und Tabelle 3.19.

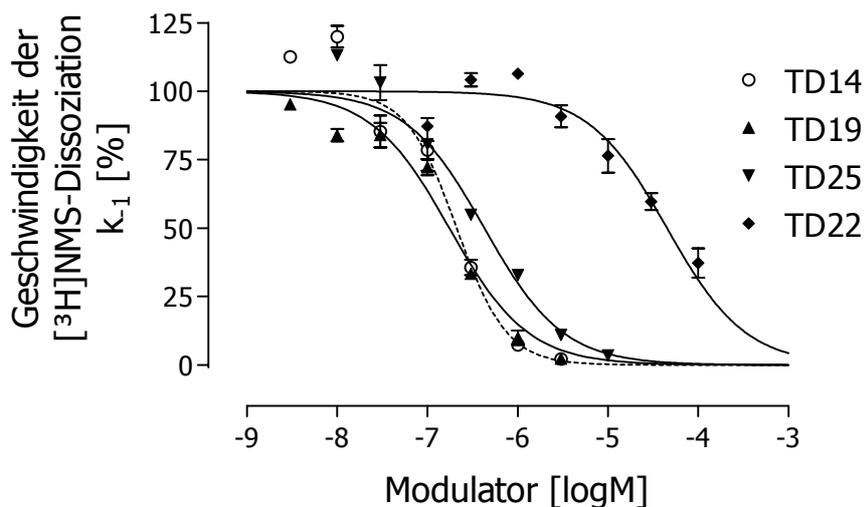


Abbildung 3.15: Konzentrations-Effekt-Kurven von TD19, TD25 und TD22 zur Illustration ihres Einflusses auf die Geschwindigkeit der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation an M_2 -Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C. Die Ausgangsverbindung TD14 ist zum Zweck des Vergleiches mit aufgeführt. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante k_{-1} der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation in Prozent bezogen auf die Kontrolle in Abwesenheit des Modulators; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten.

Untersucher Modulator	$\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$	n_H	Min [%]
TD14	$6,67 \pm 0,06$	$-1,57 \pm 0,30^s$	$-0,7 \pm 10,4^{\text{ns}}$
TD19	$6,76 \pm 0,05^{\text{ns}14, p=0,31}$	$-1,13 \pm 0,13^{\text{ns}}$	$-8,4 \pm 5,9^{\text{ns}}$
TD25	$6,37 \pm 0,07^{\text{s}14, p=0,01}$	$-1,04 \pm 0,17^{\text{ns}}$	$-0,3 \pm 8,2^{\text{ns}}$
TD22	$4,35 \pm 0,07^{\text{s}14, p<0,01}$	$-0,84 \pm 0,13^{\text{ns}}$	$21,3 \pm 11,4^{\text{ns}}$

Tabelle 3.18: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.15 ermittelte Parameter. s/ns : Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied der Kurvensteilheit n_H zu -1 bzw. des unteren Kurvenplateaus Min zu 0 % (F-Test); $s/\text{ns}14$: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied des betreffenden $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$ -Wertes zu demjenigen von TD14 (ungepaarter t-Test). Angegeben sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten.

Die Konzentrations-Effekt-Kurven der Succinimid-substituierten Modulatoren für den Hemmeffekt auf die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation entsprechen einander im Bezug auf die Kurvensteilheit sowie die Lage des unteren Plateaus. Für alle drei Testsubstanzen kann daher ein Bindungsverhalten zu $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten Rezeptoren vermutet werden, das dem Massenwirkungsgesetz gehorcht.

Während die Strukturvariation auf der Ammonium-Seite (TD19) die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -dissoziationsverzögernde Wirksamkeit nicht signifikant verändert, vermindert sich

der pEC_{0,5diss}-Wert bei der entgegengesetzten Modifikation (TD25) signifikant um annähernd 0,3 Dekaden. Die Kombination beider Substitutionen liefert mit TD22 einen Modulator, der mit rund 2,3 Dekaden massiv an Affinität zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor eingebüßt hat.

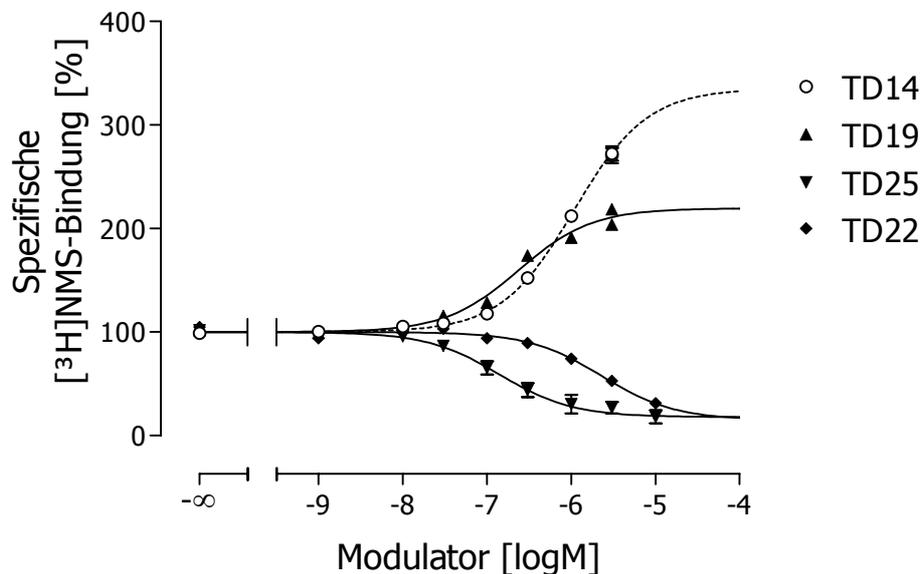


Abbildung 3.16: Konzentrations-Effekt-Kurven von TD19, TD25 und TD22 zur Illustration ihres Einflusses auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS an M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C. Die Ausgangsverbindung TD14 ist zum Zweck des Vergleiches mit aufgeführt. *Ordinate:* Spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Angegeben sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten.

Untersucher	pK _A	pα	B _{f p}	p(αK _A) -
Modulator			[%]	pEC _{0,5diss}
TD14	4,62 ± 0,40	1,87 ± 0,37	97,4	-0,18
TD19	6,08 ± 0,09 ^{ns14, p=0,07(W)}	0,89 ± 0,06 ^{ns14, p=0,12(W)}	82,1	0,21
TD25	7,02 ± 0,12 ^{s14, p<0,01}	-0,92 ± 0,16 ^{s14, p<0,01}	6,7	-0,27
TD22	5,75 ± 0,03 ^{ns14, p=0,11(W)}	-0,94 ± 0,13 ^{s14, p<0,01}	4,0	0,46

Tabelle 3.19: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.16 sowie der pEC_{0,5diss}-Werte aus Tabelle 3.18 ermittelte Parameter. B_{f p}: Fraktionelle Rezeptorbesetzung mit [³H]NMS im Plateaubereich der Kurve bei hohen Modulator-Konzentrationen; ^{s14/ns14}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied der betreffenden Kenngröße zu derjenigen von TD14 (ungepaarter t-Test, für den Fall statistisch ungleicher Standardfehler wurde eine Korrektur nach Welch (W) hinzugenommen). Für pK_A und pα sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten angegeben.

Bei vergleichender Betrachtung von TD19, TD22 und TD25 fällt deren deutlich unterschiedliche Kooperativität auf. Eine Succinimid-Substitution auf der Ammonium-Seite (TD19) verändert den $p\alpha$ -Wert im Vergleich zu TD14 nicht. Wird die Strukturvariation hingegen auf der Silizium-Seite durchgeführt (TD25), erfährt die Kooperativität eine Umkehr in den negativen Bereich, wofür vor allem die ausgeprägte Zunahme der Affinität zu freien Rezeptoren um etwa 2,4 Dekaden (siehe Tabelle 3.20) verantwortlich zu sein scheint. Die Entfernung von beiden lateralen aromatischen Systemen (TD22) bewirkt ebenfalls eine starke negative Kooperativität, deren Ursache bei unverändertem pK_A -Wert in einem massiv vermindertem $pEC_{0,5diss}$ -Wert begründet ist.

Vor dem Hintergrund der Beeinflussung der [3H]NMS-Gleichgewichtsbindung kann demnach eine klare Struktur-Wirkungs-Beziehung abgeleitet werden. Das Vorhandensein eines aromatischen Systems auf der Silizium-Seite ist für die positive Kooperativität offenbar zwingend erforderlich, wohingegen eine derartige Abhängigkeit von der Struktur des Ammonium-Endes anscheinend nicht besteht.

3.2.7 Silizium-haltiger Modulator ohne permanente Ladung

TD32 ist eine Verbindung, die von allen übrigen getesteten Silizium-haltigen Modulatoren dadurch abweicht, dass sie anstelle des quartären einen tertiären Stickstoff enthält. Die restliche Molekülgestalt entspricht mit zwei endständigen Naphthalimid-Gruppen derjenigen von TD14.

Die experimentellen Befunde mit TD32 an Antagonist-besetzten Rezeptoren sind in Abbildung 3.17 sowie Tabelle 3.20 veranschaulicht, der Einfluss dieses Modulators auf die [3H]NMS-Gleichgewichtsbindung ist in Abbildung 3.18 und Tabelle 3.21 gezeigt.

Die Konzentrations-Effekt-Kurve von TD32 in Abbildung 3.17 zeigt nicht signifikante Abweichungen von der angenommenen Steilheit -1 sowie vom angenommenen unteren Plateau 0% . Die bei der Ausgangsverbindung TD14 gefundene, hohe Kurvensteilheit wurde demnach durch die Strukturvariation „normalisiert“.

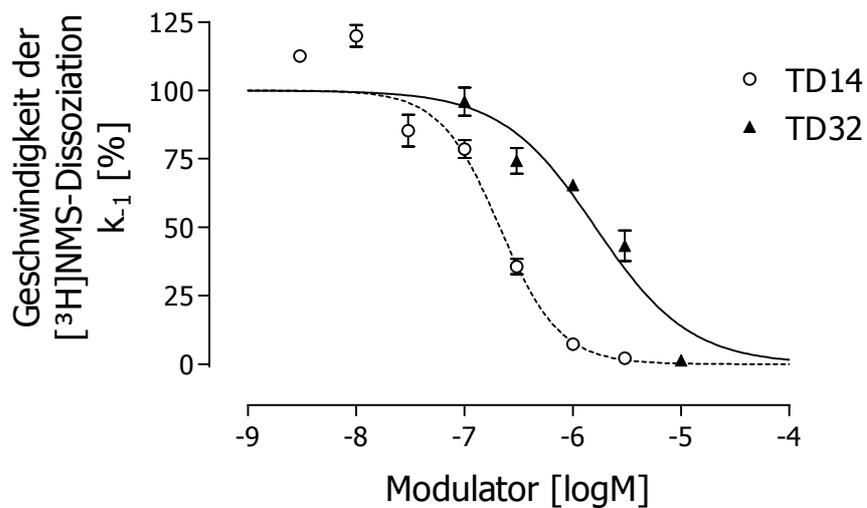


Abbildung 3.17: Konzentrations-Effekt-Kurve von TD32 zur Illustration seines Einflusses auf die Geschwindigkeit der [³H]NMS-Dissoziation an M₂-Rezeptoren des Hausschweins in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C. Die Ausgangsverbindung TD14 ist zum Zweck des Vergleiches mit aufgeführt. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante k_{-1} der [³H]NMS-Dissoziation in Prozent bezogen auf die Kontrolle in Abwesenheit des Modulators; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten.

Untersucher Modulator	$pEC_{0,5diss}$	n_H	Min [%]
TD14	$6,67 \pm 0,06$	$-1,57 \pm 0,30^s$	$-0,7 \pm 10,4^{ns}$
TD32	$5,79 \pm 0,07^{s14, p<0,01}$	$-0,99 \pm 0,16^{ns}$	$-19,8 \pm 11,7^{ns}$

Tabelle 3.20: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.17 ermittelte Parameter. ^{s/ns}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied der Kurvensteilheit n_H zu -1 bzw. des unteren Kurvenplateaus Min zu 0 % (F-Test); ^{s14}: Signifikanter Unterschied des $pEC_{0,5diss}$ -Wertes von TD32 zu demjenigen von TD14 (ungepaarter t-Test). Angegeben sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten.

Der Austausch des quartären Stickstoffes in TD14 durch einen tertiären Stickstoff in TD32 vermindert die Affinität der Testsubstanz zu Antagonist-besetzten Rezeptoren signifikant um annähernd 0,9 Dekaden, die Affinität zu freien Rezeptoren änderte sich hingegen nicht. Die [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung wird durch die Modulatoren TD14 und TD32 in identischen Ausmaß gefördert.

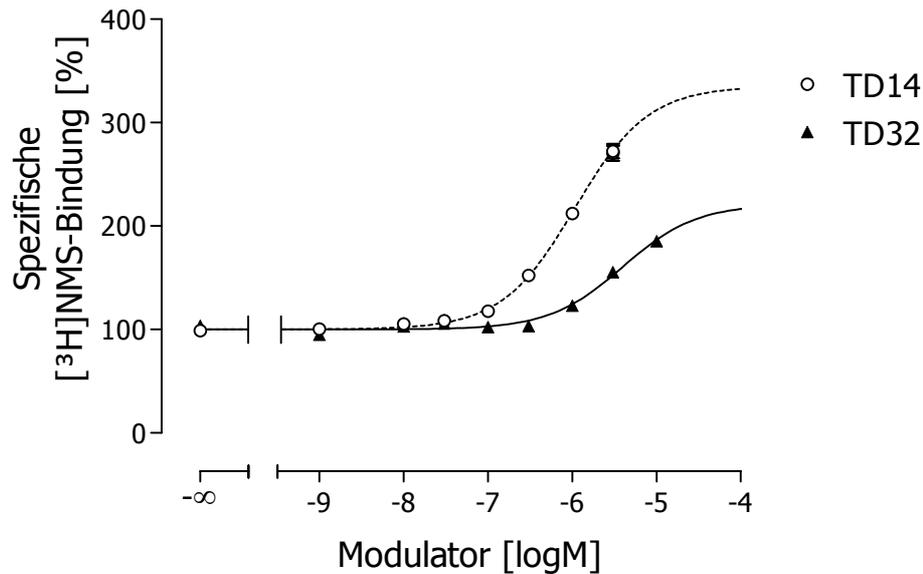


Abbildung 3.18: Konzentrations-Effekt-Kurve von TD32 zur Illustration seines Einflusses auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ an M_2 -Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37 °C. Die Ausgangsverbindung TD14 ist zum Zweck des Vergleiches mit aufgeführt. *Ordinate:* Spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Angegeben sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten.

Untersucher Modulator	pK_A	$\text{p}\alpha$	$\text{B}_{f\text{p}}$ [%]	$\text{p}(\alpha\text{K}_A) -$ $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$
TD14	$4,62 \pm 0,40$	$1,87 \pm 0,37$	97,4	-0,18
TD32	$4,82 \pm 0,10^{\text{ns14, p=0,65}}$	$0,93 \pm 0,02^{\text{ns14, p=0,13(W)}}$	83,7	-0,04

Tabelle 3.21: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.18 sowie der $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$ -Werte aus Tabelle 3.20 ermittelte Parameter. $\text{B}_{f\text{p}}$: Fraktionelle Rezeptorbesetzung mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ im Plateaubereich der Kurve bei hohen Modulator-Konzentrationen; $^{\text{ns14/ns14}}$: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied der betreffenden Kenngröße von TD32 zu derjenigen von TD14 (ungepaarter t-Test, für den Fall statistisch ungleicher Standardfehler wurde eine Korrektur nach Welch (W) hinzugenommen). Für pK_A und $\text{p}\alpha$ sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten angegeben.

3.3 Epitopabhängigkeit der Affinität ausgewählter Modulatoren an [³H]NMS-besetzten humanen M₂-Rezeptoren unter Verwendung von Membransuspensionen aus COS7-Zellen

Für W84 konnte gezeigt werden, dass seine M₂/M₅-Selektivität an Antagonist-besetzten M₂-Rezeptoren vollständig auf die Aminosäuren ¹⁷⁷Tyrosin und ⁴²³Threonin zurückgeführt werden kann (Voigtländer et al., 2003; siehe 1.5). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob der Austausch eines quartären Stickstoffes in W84 durch ein Silizium-Atom einen Einfluss auf die Abhängigkeit der Alloster-Bindung von den genannten Epitopen hat. Zu diesem Zweck wurden Zweipunkt-kinetische Untersuchungen mit klonierten M₂- bzw. M₅-Wildtyp-Rezeptoren sowie punktmutierten M₂-Rezeptoren durchgeführt, die von COS7-Zellen exprimiert wurden. Von den zuvor untersuchten Silizium-haltigen Verbindungen kamen in diesen Studien nicht alle Modulatoren zum Einsatz, es wurden einige stark bindungsfördernde und dadurch besonders interessante Vertreter ausgewählt.

Die experimentelle Durchführung der Zweipunkt-kinetischen Studien erfolgte jeweils in einem Na-K-Phosphat-Puffer bei pH 7,4 und 23 °C gemäß der in 2.3.2.2 erläuterten Methodik. Die gemessenen Bindungswerte wurden in Abhängigkeit von der Zeit in Form einer monoexponentiell abfallenden Regressionskurve analysiert. Der Ausgangspunkt der Kurve ist dabei definiert durch die spezifische [³H]NMS-Bindung vor Beginn der Dissoziationsmessung (t₀). Der Kurvenendpunkt entspricht der Radioligand-Bindung zu einem vorher festgesetzten Zeitpunkt t_x nach Zugabe eines Gemisches aus Atropin und einer bestimmten Modulator-Konzentration, was den Beginn der Dissoziationsmessung darstellte. Abbildung 3.19 veranschaulicht dies anhand von einigen repräsentativen Dissoziations-Kurven, die durch den Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen des Modulators W84 an humanen M₂-Rezeptoren erzielt wurden.

Analog zu den kompletten Dissoziationskurven in Abbildung 3.2 wird der Verlauf der durch die zwei Punkte definierten Kurven in Abbildung 3.19 durch die Geschwindigkeits-Dissoziationskonstante k₋₁ beschrieben. Die k₋₁-Werte der Disso-

zationskurven in Anwesenheit eines Modulators können in Relation zum k_{-1} -Wert der Kontroll-Kurve gesetzt und gegen die Modulator-Konzentration aufgetragen werden. Die anschließende nicht lineare Regressionsanalyse liefert eine Konzentrations-Effekt-Kurve. Abbildung 3.20 veranschaulicht dies anhand der in Abbildung 3.19 dargestellten Dissoziationskurven für W84.

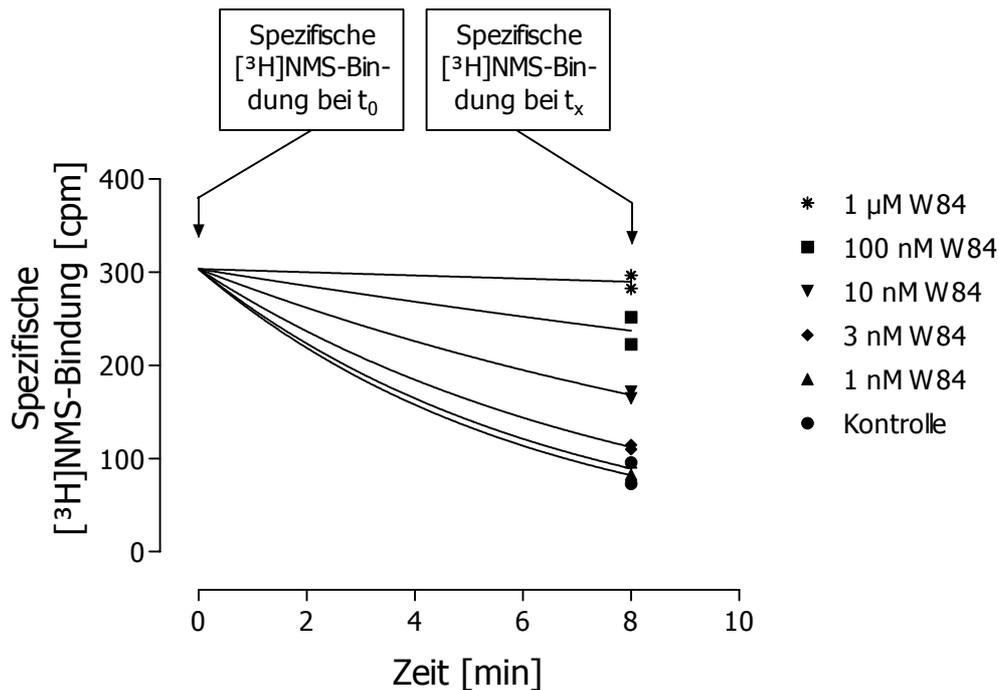


Abbildung 3.19: Dissoziationskurven als Ergebnis repräsentativer Zweipunkt-kinetischer Experimente unter Verwendung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (1 nM), verschiedenen Konzentrationen des allosterischen Modulators W84 sowie in COS7-Zellen exprimierten humanen M_2 -Rezeptoren in Na-K-Phosphat-Puffer bei pH 7,4 und 23 °C. *Ordinate:* Spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in cpm; *Abszisse:* Zeit nach Zugabe des Atropin-Testsubstanz-Gemisches als Startpunkt der Dissoziationsmessung in min. Dargestellt sind die Einzelwerte aus jeweils einem Experiment mit Doppelbestimmung.

Die in Abbildung 3.20 gezeigte Konzentrations-Effekt-Kurve entspricht prinzipiell derjenigen aus Abbildung 3.3, die basierend auf Untersuchungen kompletter Dissoziationsverläufe erstellt wurde. Die in kinetischen Studien mit Membransuspensionen aus COS7-Zellen in Na-K-Phosphat-Puffer bei pH 7,4 und 23 °C gemessenen mittleren Halbwertszeiten der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation unter Kontrollbedingungen sowie die gemittelten Zahlenwerte der Geschwindigkeits-Dissoziationskonstanten k_{-1} der fünf verwendeten Rezeptor-Typen sind in Tabelle 3.22 zusammengefasst.

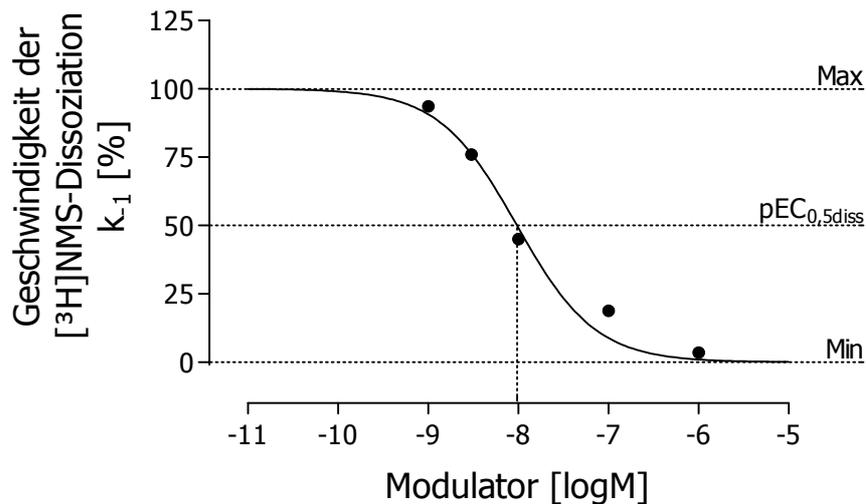


Abbildung 3.20: Auf der Basis der Dissoziationskurven aus Abbildung 3.19 erstellte Konzentrations-Effekt-Kurve von W84. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante k_{-1} der [³H]NMS-Dissoziation in Prozent bezogen auf die Kontrolle in Abwesenheit des Modulators; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Im Gegensatz zu den im weiteren Verlauf des Ergebnisteils dargestellten Befunden gehen die hier dargestellten Messpunkte jeweils auf einen Versuch zurück. Weitere Erläuterungen finden sich in 3.2.

Rezeptor-Typ	$t_{1/2}$ [min]	k_{-1}	Versuchszahl
M ₂ -Wildtyp	5,03 ± 0,25	0,146 ± 0,006	31
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr → Gln	5,04 ± 0,26	0,147 ± 0,006	32
M ₂ ⁴²³ Thr → His	15,15 ± 0,33	0,046 ± 0,001	29
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr → Gln + ⁴²³ Thr → His	23,26 ± 1,09	0,031 ± 0,001	28
M ₅ -Wildtyp	109,78 ± 3,30	0,007 ± 0,001	33

Tabelle 3.22: Halbwertszeiten $t_{1/2}$ und Geschwindigkeits-Dissoziationskonstanten k_{-1} der [³H]NMS-Dissoziation von den in dieser Arbeit verwendeten Muskarin-Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren unter Kontrollbedingungen. Angegeben sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus der genannten Anzahl unabhängiger Versuche.

3.3.1 Epitopabhängigkeit der Affinität von W84

Die mit W84, dem bekanntesten Vertreter der Klasse der Alkan-Bisammonium-Modulatoren, im Rahmen Zweipunkt-kinetischer Studien erzielten Befunde sind in Abbildung 3.21 sowie in Tabelle 3.23 veranschaulicht.

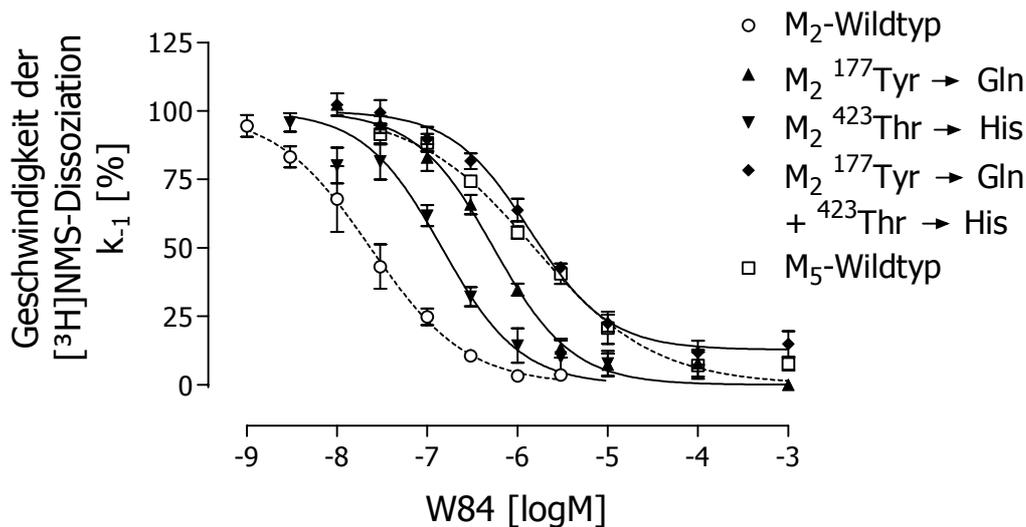


Abbildung 3.21: Konzentrations-Effekt-Kurven von W84 zur Illustration seines Einflusses auf die Geschwindigkeit der $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation von humanen M_2 - bzw. M_5 -Wildtyp- sowie punktmutierten M_2 -Rezeptoren in Na-K-Phosphat-Puffer bei pH 7,4 und 23 °C. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante k_{-1} der $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation in Prozent bezogen auf die Kontrolle in Abwesenheit des Modulators; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus vier bis fünf unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

Untersuchter Rezeptor-Typ	$\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$	n_H	Min [%]
M_2 -Wildtyp	$7,63 \pm 0,06$	$-0,82 \pm 0,07^s$	$0,7 \pm 3,8^{\text{ns}}$
$M_2^{177}\text{Tyr} \rightarrow \text{Gln}$	$6,27 \pm 0,04^{s2, p<0,01}$	$-1,01 \pm 0,09^{\text{ns}}$	$3,4 \pm 2,4^{\text{ns}}$
$M_2^{423}\text{Thr} \rightarrow \text{His}$	$6,84 \pm 0,06^{s2, p<0,01}$	$-0,78 \pm 0,09^{\text{ns}}$	$6,1 \pm 3,6^{\text{ns}}$
$M_2^{177}\text{Tyr} \rightarrow \text{Gln} + ^{423}\text{Thr} \rightarrow \text{His}$	$5,86 \pm 0,06^{\text{ns}5, p=0,54}$	$-0,90 \pm 0,10^{\text{ns}}$	$12,8 \pm 2,4^s$
M_5 -Wildtyp	$5,81 \pm 0,05$	$-0,72 \pm 0,07^{\text{ns}}$	$4,9 \pm 3,1^{\text{ns}}$

Tabelle 3.23: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.21 ermittelte Parameter. $^s/\text{ns}$: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied der Kurvensteilheit n_H zu -1 bzw. des unteren Kurvenplateaus Min zu 0 % (F-Test); $^{s2}/\text{ns}5$: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied des betreffenden $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$ -Wertes zu demjenigen des M_2 - bzw. M_5 -Wildtyps (ungepaarter t-Test). Angegeben sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus vier bis fünf unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

Die Konzentrations-Effekt-Kurven von W84, die unter Verwendung verschiedener Rezeptor-Typen erzielt wurden, sind durch eine einheitliche Gestalt gekennzeichnet. Die Kurvensteilheit n_H weicht nur im Fall des M_2 -Wildtyps signifikant von -1 ab und mit Ausnahme der Doppelmutante ist W84 an allen übrigen Rezeptor-Typen in der Lage, die $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation vollständig zu unterdrücken.

Die Studien zur Epitopabhängigkeit der Alloster-Bindung waren auf die Bestimmung des Wendepunktes der Konzentrations-Effekt-Kurve ausgerichtet, so dass Zweipunkt-kinetische Studien durchgeführt wurden. Um hingegen den Kurvenverlauf im Detail zufriedenstellend beschreiben zu können, ist es vermutlich erforderlich, den kompletten Dissoziationsverlauf zu verfolgen. Daher wird den signifikanten Abweichungen von $n_H = -1$ und $\text{Min} = 0 \%$ hier keine Bedeutung beigemessen, was gleichermaßen auch für die übrigen, analog getesteten Modulatoren gilt. Beide untersuchten Epitope sind für die hochaffine Bindung vom W84 an [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptoren von Bedeutung. Der Austausch von M₂⁴²³Threonin gegen Histidin geht einher mit einem Affinitäts-Verlust von etwa 0,8 Dekaden, im Fall der Einzelmutation M₂¹⁷⁷Tyr → Gln beträgt sie rund 1,4 Dekaden. Werden beide Mutationen gemeinsam in den M₂-Rezeptor eingebracht, vermindert sich die Affinität um etwa 1,8 Dekaden und entspricht dem M₅-Niveau. Diese Befunde stehen in Einklang mit den von Voigtländer et al. (2003) veröffentlichten Ergebnissen. Auch dort wurde eine Beteiligung beider Epitope für die Interaktion von W84 mit Antagonist-besetzten M₂-Rezeptoren sowie eine größere Bedeutung von ¹⁷⁷Tyrosin im Vergleich zu ⁴²³Threonin gefunden. Darüber hinaus konnte auch von Voigtländer et al. (2003) die komplette Affinitätsdifferenz von W84 zwischen dem M₂- und dem M₅-Rezeptor-Subtyp ausschließlich auf der Basis dieser beiden Aminosäuren erklärt werden.

3.3.2 Epitopabhängigkeit der Affinität von TD2

Die Ausgangsverbindung der Silizium-haltigen Modulatoren, die sich strukturell in nur einem Atom von W84 unterscheidet, wurde ebenfalls in Zweipunkt-kinetischen Experimenten getestet. Über die dabei erzielten Ergebnisse gibt Abbildung 3.22 und Tabelle 3.24 Auskunft.

Die an der Mutante M₂¹⁷⁷Tyr → Gln erhaltene Kurve ist gekennzeichnet durch eine hohe Steilheit sowie ein unteres Plateau, das signifikant oberhalb von 0 % liegt. Eine signifikant erhöhte Kurvensteilheit findet sich auch für die M₂⁴²³Thr → His-Einzelmutation und das untere Plateau der M₅-Wildtyp-Kurve unterscheidet sich ebenfalls signifikant von 0 %.

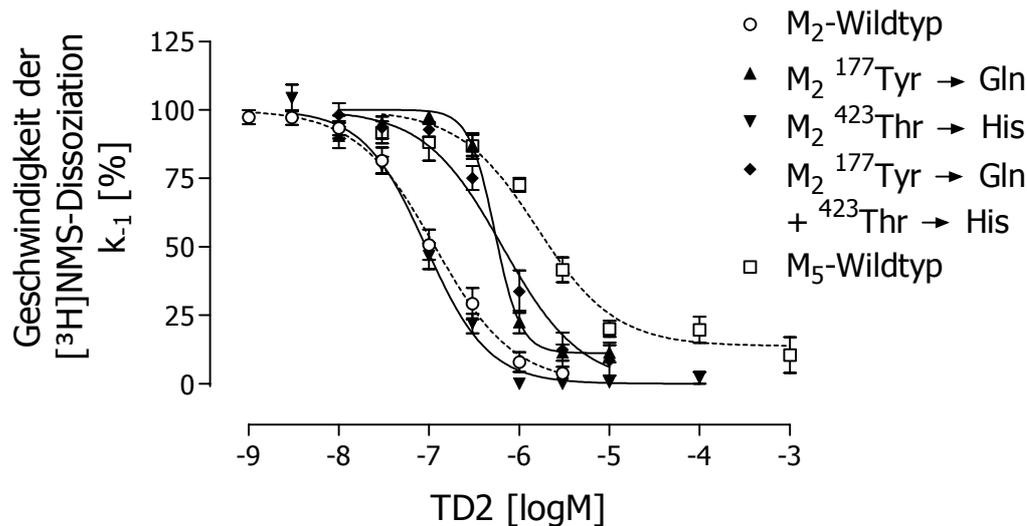


Abbildung 3.22: Konzentrations-Effekt-Kurven von TD2 zur Illustration seines Einflusses auf die Geschwindigkeit der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation von humanen M_2 - bzw. M_5 -Wildtyp- sowie punktmutierten M_2 -Rezeptoren in Na-K-Phosphat-Puffer bei pH 7,4 und 23 °C. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante k_{-1} der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation in Prozent bezogen auf die Kontrolle in Abwesenheit des Modulators; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus vier bis sechs unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

Untersuchter Rezeptor-Typ	$\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$	n_H	Min [%]
M_2 -Wildtyp	$6,93 \pm 0,04$	$-1,04 \pm 0,09^{\text{ns}}$	$-1,2 \pm 3,0^{\text{ns}}$
$\text{M}_2^{177}\text{Tyr} \rightarrow \text{Gln}$	$6,27 \pm 0,04^{\text{s2}, \text{p}<0,01}$	$-3,06 \pm 0,46^{\text{s}}$	$11,2 \pm 2,8^{\text{s}}$
$\text{M}_2^{423}\text{Thr} \rightarrow \text{His}$	$7,03 \pm 0,03^{\text{ns2}, \text{p}=0,07}$	$-1,26 \pm 0,10^{\text{s}}$	$-1,1 \pm 2,0^{\text{ns}}$
$\text{M}_2^{177}\text{Tyr} \rightarrow \text{Gln} + ^{423}\text{Thr} \rightarrow \text{His}$	$6,19 \pm 0,06^{\text{s5}, \text{p}<0,01}$	$-1,29 \pm 0,17^{\text{ns}}$	$-3,0 \pm 5,7^{\text{ns}}$
M_5 -Wildtyp	$5,80 \pm 0,08$	$-0,99 \pm 0,17^{\text{ns}}$	$13,7 \pm 4,2^{\text{s}}$

Tabelle 3.24: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.22 ermittelte Parameter. ^{s/ns}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied der Kurvensteilheit n_H zu -1 bzw. des unteren Kurvenplateaus Min zu 0 % (F-Test); ^{s2/ns2/s5}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied des betreffenden $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$ -Wertes zu demjenigen des M_2 - bzw. M_5 -Wildtyps (ungepaarter t-Test). Angegeben sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus vier bis sechs unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

Der Austausch der Aminosäure $\text{M}_2^{177}\text{Tyrosin}$ gegen Glutamin geht einher mit einer signifikanten, annähernd 0,7 Dekaden umfassenden Abnahme der Affinität, wohingegen $\text{M}_2^{423}\text{Threonin}$ keine Bedeutung für die TD2-Bindung besitzt. Diese Befunde werden durch den $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$ -Wert der Rezeptor-Doppelmutante gestützt, der

sich mit demjenigen der M₂¹⁷⁷Tyr → Gln-Kurve deckt (p = 0,31; ungepaarter t-Test).

Das Epitop M₂¹⁷⁷Tyrosin ist nicht in der Lage, die hochaffine Anlagerung von TD2 an Antagonist-besetzte M₂-Rezeptoren im Vergleich zu M₅-Rezeptoren vollständig zu erklären. Daher muss zumindest eine weitere Aminosäure in die Bindung dieses Modulators involviert sein, deren Bedeutung jedoch geringer ist als die von M₂¹⁷⁷Tyrosin, worauf rund 60 % der M₂/M₅-Selektivität zurückgeführt werden können.

3.3.3 Epitopabhängigkeit der Affinität von TD14

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die zweifach Naphthalimid-substituierte Substanz TD14 untersucht, die dabei erzielten Daten sind in Abbildung 3.23 und Tabelle 3.25 illustriert.

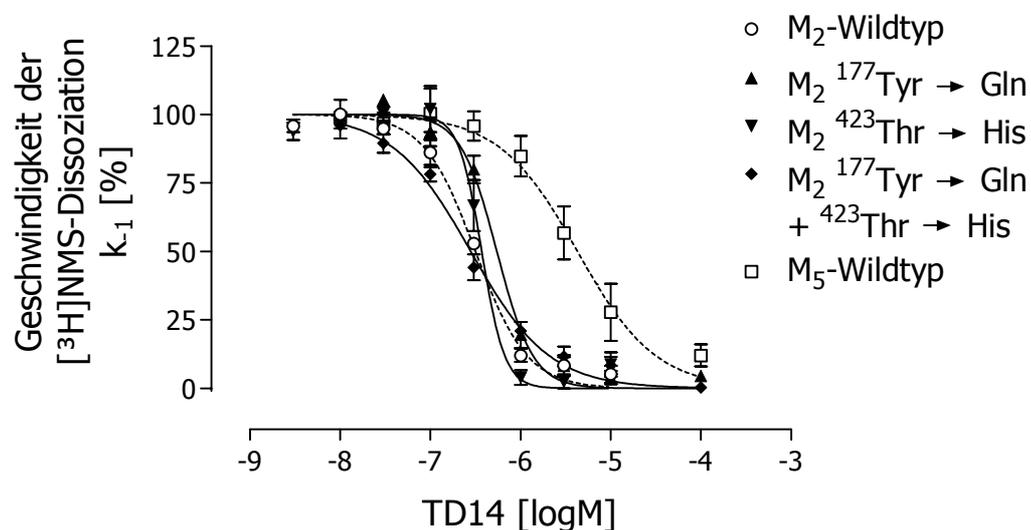


Abbildung 3.23: Konzentrations-Effekt-Kurven von TD14 zur Illustration seines Einflusses auf die Geschwindigkeit der [³H]NMS-Dissoziation von humanen M₂- bzw. M₅-Wildtyp- sowie punktmutierten M₂-Rezeptoren in Na-K-Phosphat-Puffer bei pH 7,4 und 23 °C. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante k₋₁ der [³H]NMS-Dissoziation in Prozent bezogen auf die Kontrolle in Abwesenheit des Modulators; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus vier bis sechs unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

Untersucher Rezeptor-Typ	pEC _{0,5diss}	n _H	Min [%]
M ₂ -Wildtyp	6,50 ± 0,04	-1,51 ± 0,15 ^S	5,0 ± 2,8 ^{ns}
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr → Gln	6,26 ± 0,03 ^{s2, p<0,01}	-2,17 ± 0,24 ^S	5,1 ± 2,6 ^{ns}
M ₂ ⁴²³ Thr → His	6,43 ± 0,04 ^{ns2, p=0,25}	-3,41 ± 1,16 ^S	4,7 ± 3,3 ^{ns}
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr → Gln + ⁴²³ Thr → His	6,55 ± 0,04 ^{ns2, p=0,38}	-0,99 ± 0,08 ^{ns}	2,6 ± 2,1 ^{ns}
M ₅ -Wildtyp	5,37 ± 0,08	-1,04 ± 0,19 ^{ns}	6,6 ± 6,7 ^{ns}

Tabelle 3.25: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.23 ermittelte Parameter. ^{s/ns}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied der Kurvensteilheit n_H zu -1 bzw. des unteren Kurvenplateaus Min zu 0 % (F-Test); ^{s2/ns2}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied des betreffenden pEC_{0,5diss}-Wertes zu demjenigen des M₂-Wildtyps (ungepaarter t-Test). Angegeben sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus vier bis sechs unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

Die Konzentrations-Effekt-Kurven, die mit der Silizium-haltigen Verbindung TD14 an den verschiedenen Rezeptor-Typen erzielt wurden, entsprechen sich hinsichtlich des unteren Kurvenplateaus, das sich durchweg leicht, aber in keinem Fall signifikant oberhalb von 0 % befindet. Die Steilheit hingegen unterscheidet die Kurven deutlicher voneinander, lediglich für den M₅-Wildtyp-Rezeptor sowie für die Rezeptor-Doppelmutante findet sich ein n_H-Wert mit nicht signifikanter Differenz zu -1.

Die Mutationen, die am M₂-Rezeptor-Protein vorgenommen wurden, ziehen kaum Affinitäts-Änderungen von TD14 nach sich. Die Einführung von Histidin anstelle von M₂⁴²³Threonin lässt die Affinität nicht signifikant abfallen und auch der zusätzliche Austausch von M₂¹⁷⁷Tyrosin durch Glutamin verändert den pEC_{0,5diss}-Wert im Vergleich zum M₂-Ausgangswert nicht in signifikantem Umfang. Zwar ergibt sich ein signifikanter Affinitäts-Verlust in Höhe von rund 0,2 Dekaden durch den alleinigen Ersatz von M₂¹⁷⁷Tyrosin durch Glutamin, aber diese Differenz ist im Hinblick auf die rund 1,15 Dekaden umfassende M₂/M₅-Differenz marginal. Zudem entspricht die Affinität von TD14 zur [³H]NMS-besetzten Rezeptor-Doppelmutante exakt derjenigen zum M₂-Wildtyp-Rezeptor. Dem etwas erniedrigten pEC_{0,5diss}-Wert der M₂¹⁷⁷Tyr → Gln-Einzelmutation wird daher keine Bedeutung beigemessen.

Aus den experimentellen Daten ergibt sich, dass für die Bindung von TD14 an [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptoren weder M₂¹⁷⁷Tyrosin noch M₂⁴²³Threonin relevant sind. Das Modulator-Molekül stützt seine M₂/M₅-Selektivität offensichtlich auf andere Aminosäuren.

3.3.4 Epitopabhängigkeit der Affinität von WB64

Bei der Gegenüberstellung der Befunde zur Epitopabhängigkeit von TD2 und TD14 (siehe 3.3.2 und 3.3.3) fällt der Bedeutungsverlust der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin auf, wenn beide Phthalimid-Reste in TD2 durch Naphthalimid (TD14) ersetzt werden. Eine solche Abhängigkeit der Epitope von der Art des lateralen Ringsystems ist aber nicht nur bei den Silizium-haltigen Substanzen, sondern auch innerhalb der Klasse der Alkan-Bisammonium-Verbindungen denkbar. Aus diesem Grund wurde mit WB64 das Silizium-freie Analogon zu TD14 untersucht, das ebenfalls zwei Naphthalimid-Reste trägt. Die experimentellen Ergebnisse sind in Abbildung 3.24 und Tabelle 3.26 dargestellt.

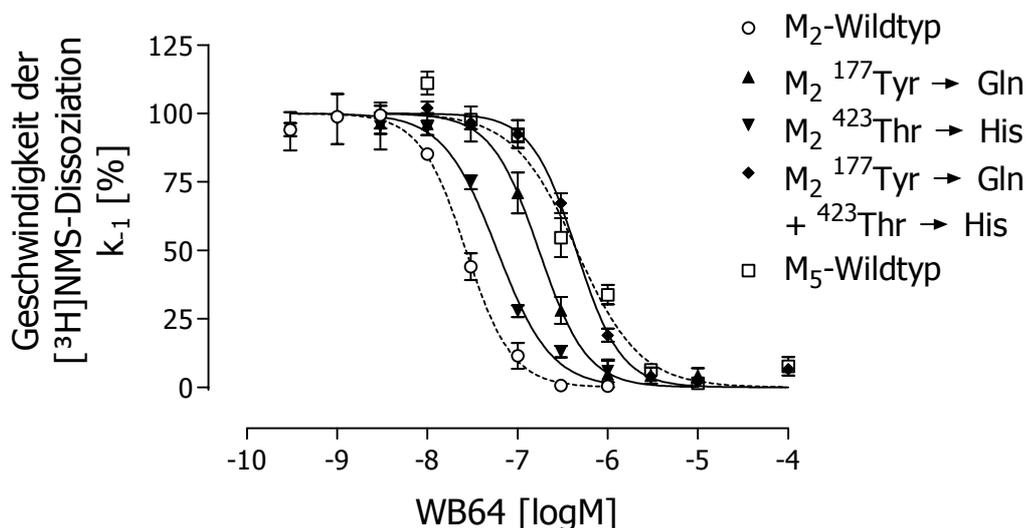


Abbildung 3.24: Konzentrations-Effekt-Kurven von WB64 zur Illustration seines Einflusses auf die Geschwindigkeit der [³H]NMS-Dissoziation von humanen M₂- bzw. M₅-Wildtyp- sowie punktmutierten M₂-Rezeptoren in Na-K-Phosphat-Puffer bei pH 7,4 und 23 °C. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante k₋₁ der [³H]NMS-Dissoziation in Prozent bezogen auf die Kontrolle in Abwesenheit des Modulators; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus drei bis vier unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

Untersucher Rezeptor-Typ	pEC _{0,5diss}	n _H	Min [%]
M ₂ -Wildtyp	7,57 ± 0,02	-1,70 ± 0,16 ^S	0,3 ± 2,1 ^{ns}
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr → Gln	6,76 ± 0,04 ^{s2, p<0,01}	-1,64 ± 0,23 ^S	3,3 ± 3,0 ^{ns}
M ₂ ⁴²³ Thr → His	7,23 ± 0,05 ^{s2, p<0,01}	-1,49 ± 0,21 ^S	6,8 ± 4,6 ^{ns}
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr → Gln + ⁴²³ Thr → His	6,35 ± 0,02 ^{ns5, p=0,90}	-1,74 ± 0,14 ^S	2,0 ± 2,1 ^{ns}
M ₅ -Wildtyp	6,34 ± 0,05	-1,23 ± 0,14 ^S	2,7 ± 3,8 ^{ns}

Tabelle 3.26: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.24 ermittelte Parameter. ^{s/ns}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied der Kurvensteilheit n_H zu -1 bzw. des unteren Kurvenplateaus Min zu 0 % (F-Test); ^{s2/ns5}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied des betreffenden pEC_{0,5diss}-Wertes zu demjenigen des M₂- bzw. M₅-Wildtyps (ungepaarter t-Test). Angegeben sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus drei bis vier unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

Alle Konzentrations-Effekt-Kurven von WB64 weisen einen Steigungskoeffizienten auf, der sich signifikant von -1 unterscheidet. Die unteren Kurvenplateaus liegen hingegen ausnahmslos auf dem 0 %-Niveau.

Der pEC_{0,5diss}-Wert von WB64 nimmt bei der M₂¹⁷⁷Tyr → Gln-Einzelmutation um etwa 0,8 Dekaden ab, im Falle des Austausches von M₂⁴²³Threonin durch Histidin beträgt die Differenz mit rund 0,35 Dekaden etwa die Hälfte. Der an der Doppelmutante ermittelte Affinitäts-Wert entspricht demjenigen des M₅-Wildtyp-Rezeptors.

Die höheraffinere Bindung von WB64 an [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptoren gegenüber dem M₅-Subtyp beruht somit komplett auf ¹⁷⁷Tyrosin und ⁴²³Threonin, wobei der unterschiedliche Beitrag beider Epitope zur Subtypselektivität dieser Verbindung annähernd demjenigen Verhältnis entspricht, welches auch für W84 gefunden wurde (siehe 3.3.1).

3.3.5 Epitopabhängigkeit der Affinität von TD15

Die beiden Silizium-haltigen Modulatoren TD2 und TD14 weisen hinsichtlich der Bedeutung der Epitope M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin für die hochaffine M₂-Bindung einen Unterschied auf. Während TD2 mit M₂¹⁷⁷Tyrosin noch eines der

beiden Aminosäuren nutzt (siehe 3.3.2), spielt für die Bindung von TD14 am M₂-Rezeptor offenbar keines der beiden Epitope eine Rolle (siehe 3.3.3). Es stellt sich die Frage, ob der Bedeutungsverlust der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin auf einer Substitution beider Phthalimid-Gruppen in TD2 durch jeweils einen Naphthalimid-Rest in TD14 beruht oder ob er auch schon bei einseitiger Substitution auftritt.

Aus diesem Grund wurde die Epitopabhängigkeit von zwei Verbindungen untersucht, die sich strukturell zwischen TD2 und TD14 befinden. Eine dieser Verbindungen ist der einseitig auf der Ammonium-Seite Naphthalimid-substituierte Modulator TD15, über dessen Affinität zu den verschiedenen [³H]NMS-besetzten Wildtyp- bzw. punktmutierten Rezeptoren Abbildung 3.25 sowie Tabelle 3.27 Auskunft gibt.

Sämtliche Konzentrations-Effekt-Kurven weisen ein unteres Kurvenplateau auf, das sich nicht signifikant von 0 % unterscheidet. Zudem sind außer bei der Kurve für die M₂⁴²³Thr → His-Einzelmutation alle Steigungskoeffizienten signifikant kleiner als -1.

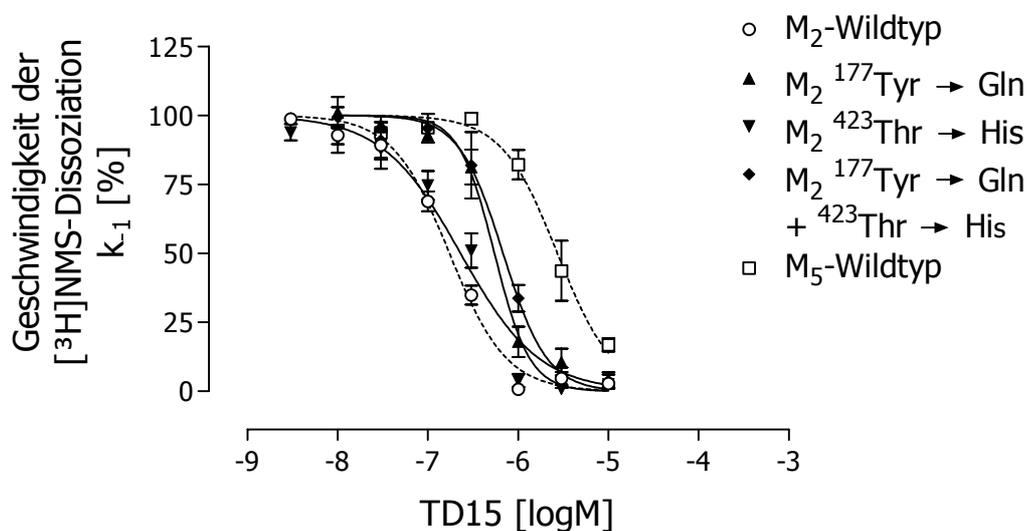


Abbildung 3.25: Konzentrations-Effekt-Kurven von TD15 zur Illustration seines Einflusses auf die Geschwindigkeit der [³H]NMS-Dissoziation von humanen M₂- bzw. M₅-Wildtyp- sowie punktmutierten M₂-Rezeptoren in Na-K-Phosphat-Puffer bei pH 7,4 und 23 °C. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante k₋₁ der [³H]NMS-Dissoziation in Prozent bezogen auf die Kontrolle in Abwesenheit des Modulators; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

Untersucher Rezeptor-Typ	pEC _{0,5diss}	n _H	Min [%]
M ₂ -Wildtyp	6,76 ± 0,03	-1,37 ± 0,13 ^S	-0,3 ± 2,8 ^{NS}
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr → Gln	6,26 ± 0,04 ^{s2, p<0,01}	-2,22 ± 0,32 ^S	7,5 ± 4,0 ^{NS}
M ₂ ⁴²³ Thr → His	6,64 ± 0,06 ^{ns2, p=0,12}	-1,31 ± 0,18 ^{NS}	-3,7 ± 4,8 ^{NS}
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr → Gln + ⁴²³ Thr → His	6,17 ± 0,05 ^{s5, p<0,01}	-1,78 ± 0,32 ^S	0,9 ± 6,2 ^{NS}
M ₅ -Wildtyp	5,56 ± 0,05	-1,41 ± 0,22 ^S	10,8 ± 9,5 ^{NS}

Tabelle 3.27: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.25 ermittelte Parameter. ^{s/ns}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied der Kurvensteilheit n_H zu -1 bzw. des unteren Kurvenplateaus Min zu 0 % (F-Test); ^{s2/ns2/s5}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied des betreffenden pEC_{0,5diss}-Wertes zu demjenigen des M₂- bzw. M₅-Wildtyps (ungepaarter t-Test). Angegeben sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

Die Affinität der einseitig Naphthalimid-substituierten Verbindung TD15 zu [3H]NMS-besetzten M₂-Rezeptoren zeigt eine Abhängigkeit von M₂¹⁷⁷Tyrosin, ein Austausch dieses Epitopes durch Glutamin, der korrespondierenden Aminosäure des M₅-Rezeptorproteins, erniedrigt sie um rund 0,5 Dekaden. Im Unterschied dazu ist M₂⁴²³Threonin ohne Bedeutung für die Bindung von TD15, die pEC_{0,5diss}-Werte der Rezeptor-Doppelmutante und der M₂¹⁷⁷Tyr → Gln-Einzelmutation entsprechen einander (p = 0,19; ungepaarter t-Test).

Durch die Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin kann nur ein Teil der M₂/M₅-Selektivität von TD15 erklärt werden. Dieser Modulator nutzt zumindest ein weiteres Epitop, welches für die verbliebene, etwa 0,7 Dekaden betragende Affinitäts-Differenz zum M₅-Wildtyp-Rezeptor verantwortlich ist.

3.3.6 Epitopabhängigkeit der Affinität von TD16

Die Befunde, die mit dem auf der Silizium-Seite Naphthalimid-substituierten Modulator TD16 erzielt wurden, sind Abbildung 3.26 und Tabelle 3.28 dargestellt.

Zwischen denen mit TD16 erzielten Konzentrations-Effekt-Kurven besteht eine ausgeprägte Übereinstimmung im Bezug auf die kurvenbeschreibenden Parameter. Die Steilheit aller Kurven ist nicht signifikant verschieden von -1, darüber hin-

aus erreichen nahezu alle Kurven ein unteres Plateau, welches dem 0 %-Niveau entspricht, lediglich für den M₅-Wildtyp-Rezeptor zeigt sich eine signifikante Abweichung.

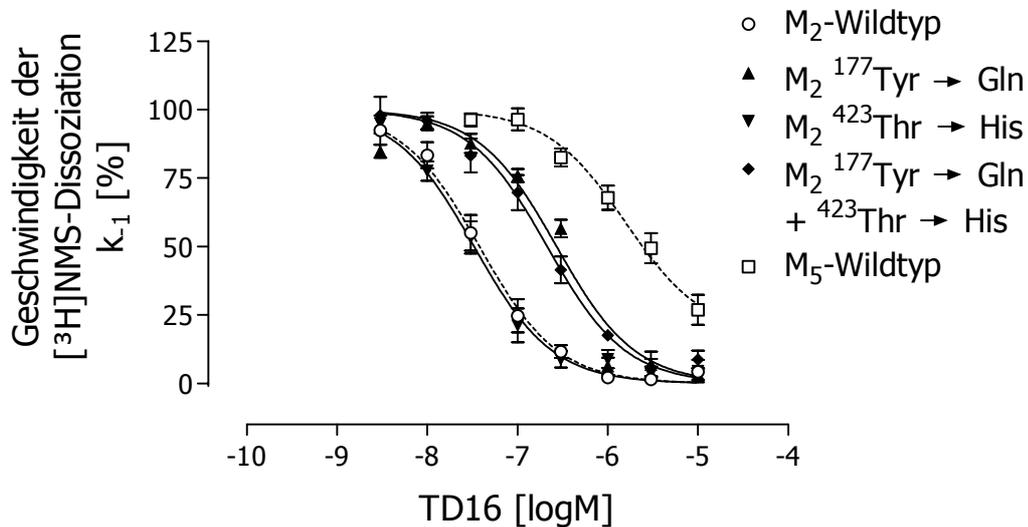


Abbildung 3.26: Konzentrations-Effekt-Kurven von TD16 zur Illustration seines Einflusses auf die Geschwindigkeit der [³H]NMS-Dissoziation von humanen M₂- bzw. M₅-Wildtyp- sowie punktmutierten M₂-Rezeptoren in Na-K-Phosphat-Puffer bei pH 7,4 und 23 °C. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante k_{-1} der [³H]NMS-Dissoziation in Prozent bezogen auf die Kontrolle in Abwesenheit des Modulators; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus vier bis sechs unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

Untersucher Rezeptor-Typ	pEC _{0,5diss}	n _H	Min [%]
M ₂ -Wildtyp	7,42 \pm 0,04	-1,09 \pm 0,11 ^{ns}	0,5 \pm 2,2 ^{ns}
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr \rightarrow Gln	6,57 \pm 0,05 ^{s2, p<0,01}	-1,21 \pm 0,13 ^{ns}	-4,3 \pm 3,6 ^{ns}
M ₂ ⁴²³ Thr \rightarrow His	7,48 \pm 0,05 ^{ns2, p=0,39}	-1,05 \pm 0,11 ^{ns}	2,8 \pm 2,2 ^{ns}
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr \rightarrow Gln + ⁴²³ Thr \rightarrow His	6,67 \pm 0,05 ^{s5, p<0,01}	-0,94 \pm 0,09 ^{ns}	3,3 \pm 3,1 ^{ns}
M ₅ -Wildtyp	5,80 \pm 0,10	-0,78 \pm 0,19 ^{ns}	17,6 \pm 6,4 ^s

Tabelle 3.28: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.26 ermittelte Parameter. ^{s/ns}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied der Kurvensteilheit n_H zu -1 bzw. des unteren Kurvenplateaus Min zu 0 % (F-Test); ^{s2/ns2/s5}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied des betreffenden pEC_{0,5diss}-Wertes zu demjenigen des M₂- bzw. M₅-Wildtyps (ungepaarter t-Test). Angegeben sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus vier bis sechs unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

Durch die Einführung der Aminosäure Glutamin anstelle von M₂¹⁷⁷Tyrosin ergibt sich gegenüber dem M₂-Wildtyp-Rezeptor ein Affinitäts-Verlust in Höhe rund 0,8 Dekaden. Die andere Punktmutation, M₂⁴²³Thr → His, wirkt sich hingegen nicht auf die Affinität von TD16 aus. Auch die analoge Modifikation der M₂¹⁷⁷Tyr → Gln-Einzelmutation zur Doppelmutation zieht keine signifikante Veränderung des pEC_{0,5diss}-Wertes nach sich (p = 0,18; ungepaarter t-Test).

Wie bei TD2 und TD15, aber im Gegensatz zu TD14, kann demnach auch ein Teil der M₂/M₅-Subtypselektivität von TD16 durch M₂¹⁷⁷Tyrosin erklärt werden. Daraus ergibt sich, dass ungeachtet der beiden Formen der einseitigen lateralen Vergrößerung die Abhängigkeit der Modulator-Bindung von dieser Aminosäure bestehen bleibt. Ein Bedeutungsverlust von M₂¹⁷⁷Tyrosin tritt erst dann auf, wenn beide Phthalimid-Gruppen durch Naphthalimid-Reste ausgetauscht werden.

3.3.7 Epitopabhängigkeit der Affinität von TD32

Im Gegensatz zu allen übrigen Verbindungen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, enthält der allosterische Modulator TD32 kein permanent positives Ladungszentrum. Um einen tieferen Einblick in die Epitopabhängigkeit dieser besonderen Substanz zu erhalten, wurde sie ebenfalls im Rahmen Zweipunkt-kinetischer Studien untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.27 und Tabelle 3.29 dargestellt.

Die erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven sind allesamt durch eine außergewöhnlich große Steilheit gekennzeichnet, zusätzlich weichen einige der unteren Kurvenplateaus in signifikantem Umfang von 0 % ab. Besonders ausgeprägt ist dies für den M₅-Wildtyp-Rezeptor, die Dissoziationsgeschwindigkeit des Radioliganden kann bei der Verwendung hoher Substanz-Konzentrationen nur etwa um die Hälfte abgesenkt werden.

Ein Austausch von M₂¹⁷⁷Tyrosin gegen Glutamin senkt den pEC_{0,5diss}-Wert von TD32 gegenüber dem M₂-Wildtyp-Rezeptor signifikant um rund 0,6 Dekaden ab und auch für die M₂⁴²³Thr → His-Einzelmutation zeigt sich im Vergleich zum M₂-Niveau ein signifikanter Affinitäts-Verlust in Höhe von etwa 0,4 Dekaden. Die Affinität von TD32 zur Rezeptor-Doppelmutante unterscheidet sich nicht signifikant

von seiner Affinität zum M₅-Wildtyp-Rezeptor ($p = 0,12$; ungepaarter t-Test). Diese Befunde legen eine Beteiligung von beiden untersuchten Aminosäuren am Bindungsverhalten von TD32 an [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptoren nahe, allerdings ist aufgrund der sehr geringen M₂/M₅-Selektivität von lediglich 0,7 Dekaden eine Beurteilung der Relevanz der untersuchten Epitope nur schwer möglich.

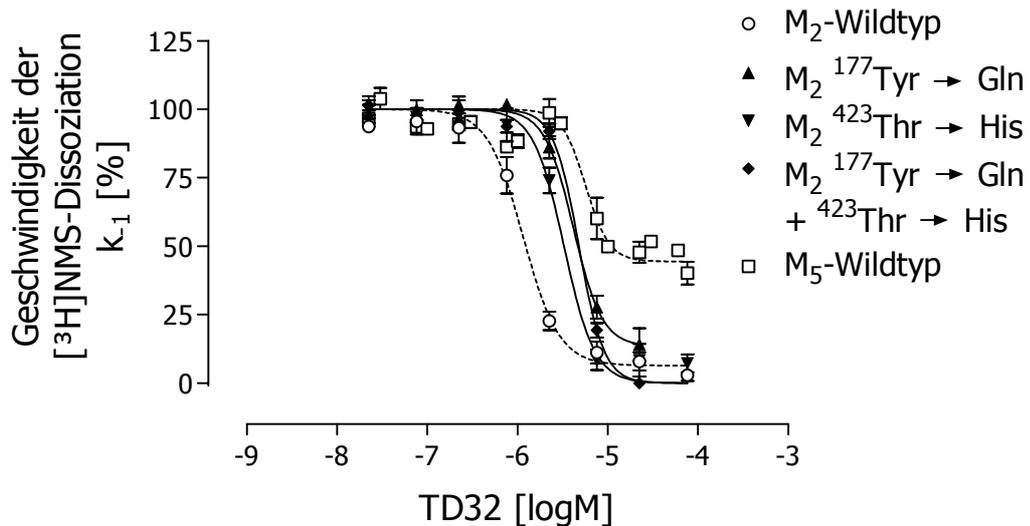


Abbildung 3.27: Konzentrations-Effekt-Kurven von TD32 zur Illustration seines Einflusses auf die Geschwindigkeit der [³H]NMS-Dissoziation von humanen M₂- bzw. M₅-Wildtyp- sowie punktmutierten M₂-Rezeptoren in Na-K-Phosphat-Puffer bei pH 7,4 und 23 °C. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante k_{-1} der [³H]NMS-Dissoziation in Prozent bezogen auf die Kontrolle in Abwesenheit des Modulators; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus vier bis sechs unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

Untersucher Rezeptor-Typ	pEC _{0,5diss}	n _H	Min [%]
M ₂ -Wildtyp	5,94 \pm 0,04	-2,19 \pm 0,34 ^s	6,4 \pm 2,5 ^s
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr \rightarrow Gln	5,38 \pm 0,05 ^{s2, p<0,01}	-2,72 \pm 0,43 ^s	13,4 \pm 4,1 ^s
M ₂ ⁴²³ Thr \rightarrow His	5,49 \pm 0,04 ^{s2, p<0,01}	-2,56 \pm 0,43 ^s	7,2 \pm 3,5 ^{ns}
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr \rightarrow Gln + ⁴²³ Thr \rightarrow His	5,32 \pm 0,02 ^{ns5, p=0,33}	-3,11 \pm 0,34 ^s	0,5 \pm 2,3 ^{ns}
M ₅ -Wildtyp	5,25 \pm 0,06	-3,31 \pm 0,98 ^s	44,4 \pm 2,7 ^s

Tabelle 3.29: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.27 ermittelte Parameter. ^{s/ns}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied der Kurvensteilheit n_H zu -1 bzw. des unteren Kurvenplateaus Min zu 0 % (F-Test); ^{s2/ns5}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied des betreffenden pEC_{0,5diss}-Wertes zu demjenigen des M₂- bzw. M₅-Wildtyps (ungepaarter t-Test). Angegeben sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus vier bis sechs unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

In den Zweipunkt-kinetischen Versuchen mit TD32 ist die bei allen fünf verwendeten Rezeptor-Typen gefundene, extrem hohe Kurvensteilheit auffällig. Da sich eine solche Kurvenform im Rahmen von kinetischen Experimenten mit Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe nicht zeigte, stellte sich die Frage, ob dies methodisch bedingt sein könnte.

Zum Start der Dissoziationsmessung wurde der Reaktionsansatz einem Gemisch von Atropin und einer bestimmten TD32-Konzentration zugegeben (siehe 2.3.2.2) und es ist denkbar, dass die Gleichgewichtsbindung von TD32 an Antagonist-besetzten Rezeptoren nicht sofort eintritt. Dies könnte besonders bei niedrigen Konzentrationen zu einer Unterschätzung seiner dissoziationsverzögernden Wirkung führen und so die auffallend steilen Konzentrations-Effekt-Kurven erklären. Um TD32 mehr Zeit zur Gleichgewichtseinstellung seiner Bindung zu geben, wurde die Versuchsmethodik modifiziert. TD32 wurde bereits in der Versuchsphase vor dem Zusatz von Atropin mit der Rezeptor-haltigen Membransuspension und dem Radioliganden inkubiert. Nach Verstreichen der bis zur Gleichgewichtseinstellung der [³H]NMS-Bindung erforderlichen Zeit, die nach Gleichung 2.18 ermittelt wurde und vom verwendeten Rezeptor-Typ abhängt, wurde die Dissoziationsmessung durch die Zugabe der Atropin-Lösung gestartet. Die weitere Versuchsdurchführung sowie die Probenaufbereitung wurde unverändert übernommen.

Wegen der positiv kooperativen Wirkung von TD32 mit [³H]NMS musste für jede TD32-Konzentration die Höhe der [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung, von der aus die nachfolgende Dissoziationsmessung ausging, separat bestimmt werden. Dazu wurde nach der Vorinkubation nur in jeweils zwei der vier auf identische Art vorbereiteten Kontroll-Ansätze Atropin-Lösung einpipettiert, die beiden verbliebenen Ansätze wurden zur Bestimmung der individuellen Gesamtbindung herangezogen. Innerhalb dieser Versuchsreihe wurden neben dem M₅-Wildtyp-Rezeptor mit M₂¹⁷⁷Tyr → Gln auch ein M₂-artiger Rezeptor untersucht. Die mit diesen Rezeptor-Typen erzielten Befunde finden sich in Abbildung 3.28 und Tabelle 3.30.

Trotz der modifizierten Versuchsmethodik blieb die signifikant erhöhte Kurvensteilheit im Prinzip erhalten. Im Falle des M₂-artigen Rezeptors hat der Steigungskoeffizient um etwa 0,9 Einheiten abgenommen, für den M₅-Wildtyp-Rezeptor ist er um weitere 0,3 Einheiten angewachsen. Die hohe Kurvensteilheit ist demnach nicht auf eine zu kurze Einwirkzeit von TD32 zurückzuführen.

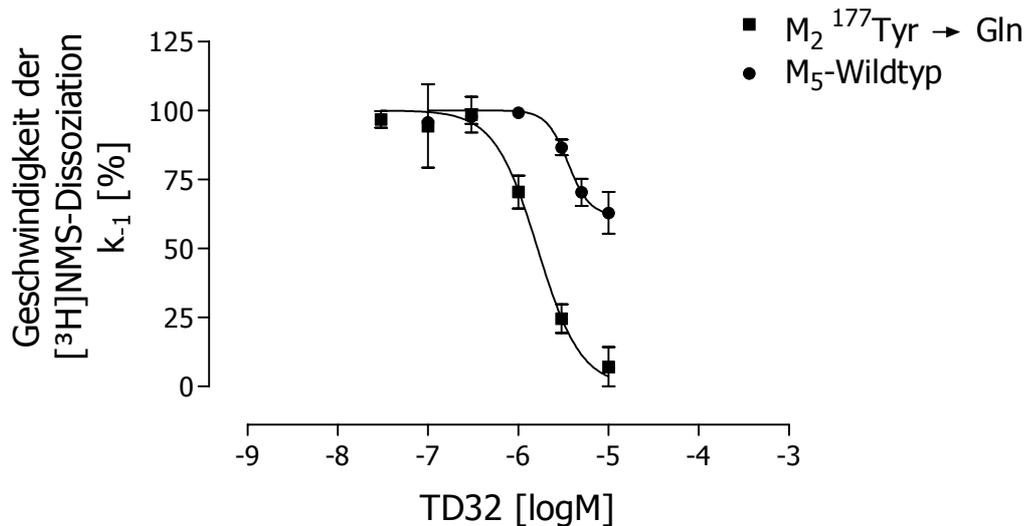


Abbildung 3.28: Konzentrations-Effekt-Kurven von TD32 zur Illustration seines Einflusses auf die Geschwindigkeit der [³H]NMS-Dissoziation von humanen für M₂¹⁷⁷Tyr → Gln bzw. M₅-Wildtyp-Rezeptoren in Na-K-Phosphat-Puffer bei pH 7,4 und 23 °C. TD32 wurde schon vor dem Zusatz der Atropin-Lösung zur Messung der [³H]NMS-Dissoziation dem Versuchsansatz hinzugegeben. Die notwendige Zeit bis zur Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS wurde anhand von Gleichung 2.18 ermittelt; sie betrug im Fall der höchsten Versuchskonzentration für M₂¹⁷⁷Tyr → Gln 1,2 h und für den M₅-Wildtyp-Rezeptor 25,4 h. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante k₋₁ der [³H]NMS-Dissoziation in Prozent bezogen auf die Kontrolle in Abwesenheit des Modulators; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus vier bis sechs unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

Untersucher Rezeptor-Typ	pEC _{0,5diss}	n _H	Min [%]
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr → Gln	5,79 ± 0,05 ^{s5} , p<0,01	-1,82 ± 0,32 ^s	5,6 ± 10,0 ^{ns}
M ₅ -Wildtyp	5,45 ± 0,06	-3,64 ± 1,53 ^s	61,9 ± 5,8 ^s

Tabelle 3.30: Auf der Basis der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 3.28 ermittelte Parameter. ^{s/ns}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied der Kurvensteilheit n_H zu -1 bzw. des unteren Kurvenplateaus Min zu 0 % (F-Test); ^{s5}: Signifikanter Unterschied des pEC_{0,5diss}-Wertes der M₂¹⁷⁷Tyr → Gln-Einzelmutation zu dem des M₅-Wildtyps (ungepaarter t-Test). Angegeben sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus vier bis sechs unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

Unter der Vorinkubation ist die Affinität von TD32 zu beiden [³H]NMS-besetzten Rezeptor-Typen signifikant angestiegen. Der pEC_{0,5diss}-Wert nahm für die M₂¹⁷⁷Tyr → Gln-Einzelmutation um etwa 0,4 Dekaden zu (p < 0,01; ungepaarter t-Test), im Falle des M₅-Wildtyp-Rezeptors waren es 0,2 Dekaden (p = 0,03; ungepaarter t-Test).

Bei diesen Studien war es möglich, orientierend den Einfluss von TD32 auf die Höhe $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindung an beiden untersuchten Rezeptor-Typen zu erfassen (siehe Abbildung 3.29), denn im Gegensatz zu den übrigen $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsexperimenten mit Membransuspensionen aus COS7-Zellen wurde hier eine Vorinkubation des Versuchsansatzes mit den Alloster vorgenommen. Es zeigte sich eine positive Kooperativität von TD32 gegenüber $[^3\text{H}]\text{NMS}$ an der $\text{M}_2^{177}\text{Tyr}$ → Gln-Einzelmutation sowie eine negative am M_5 -Wildtyp-Rezeptor.

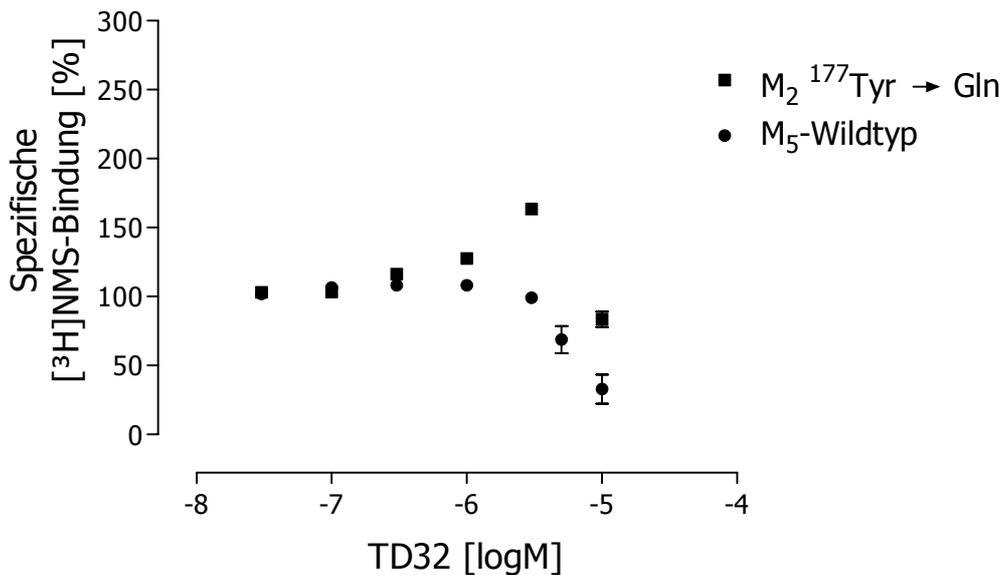


Abbildung 3.29: Einfluss verschiedener Konzentrationen von TD32 auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ an humanen $\text{M}_2^{177}\text{Tyrosin} \rightarrow \text{Glutamin}$ - bzw. M_5 -Wildtyp-Rezeptoren in Na-K-Phosphat-Puffer bei pH 7,4 und 23 °C. Die nichtlineare Regressionsanalyse der Messdaten anhand des ternären Modells wurde nicht vorgenommen, da die Affinität von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ zu diesen beiden Rezeptoren im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt wurde. *Ordinate:* Spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz; *Abszisse:* dekadischer Logarithmus der molaren Modulator-Konzentration. Angegeben sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus zwei bis sechs unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler aus vier bis sechs unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

Bei genauerer Betrachtung von Abbildung 3.29 fällt der deutliche Abfall der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung an der $\text{M}_2^{177}\text{Tyr}$ → Gln-Einzelmutation auf, wenn die TD32-Konzentration von 3 μM auf 10 μM erhöht wird. Dieser Befund könnte auf den Lösungsvermittler Dimethylsulfoxid (DMSO) zurückzuführen sein, für den ein konzentrationsabhängiger Eigeneffekt auf die Interaktion allosterischer Modulatoren mit Muskarin-Rezeptoren bekannt ist (Dittmann, 2003). Ein Zusatz von annähernd

3,5 % DMSO war erforderlich, um eine 10 mikromolare, wässrige Lösung von TD32 herzustellen. Denkbar ist aber auch, dass zum Filtrationszeitpunkt noch kein Gleichgewicht zwischen dem Rezeptor und den Liganden vorlag.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Bindung Siliziumhaltiger allosterischer Modulatoren an M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens unter Mg-Phosphat-Tris-Inkubationsbedingungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt fünfzehn verschiedene Silizium-haltige allosterische Testsubstanzen untersucht. Dabei zeigte sich, dass alle getesteten Verbindungen in der Lage sind, die Dissoziation des orthosterischen Radioliganden [³H]N-Methylscopolamin von M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens unter Mg-Phosphat-Tris-Inkubationsbedingungen konzentrationsabhängig zu verlangsamen und sie im Bereich hoher Konzentrationen vollständig aufzuheben. Von einer Ausnahme (TD22) abgesehen, handelt es sich bei allen Verbindungen um hochpotente allosterische Modulatoren, von denen bereits submikromolare Konzentrationen ausreichen, um einem messbaren Einfluss auf die Geschwindigkeit der [³H]NMS-Dissoziation zu nehmen (siehe 3.2).

Durch den überwiegenden Teil der untersuchten Modulatoren ist eine Erhöhung der [3H]NMS-Gleichgewichtsbindung möglich, die bei sechs Verbindungen (TD14, TD16, TD18, TD19, TD20 und TD32) sehr stark ausgeprägt ist. Die Affinität dieser Modulatoren ist an Antagonist-besetzten M_2 -Rezeptoren etwa zehnfach bis zwanzigfach höher als an freien Rezeptoren (siehe 3.2).

Die strukturellen Modifizierungen von TD2, die von Daiss (2004) vorgenommen wurden und aus denen die in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen hervorgingen, sind in Abbildung 4.1 veranschaulicht.

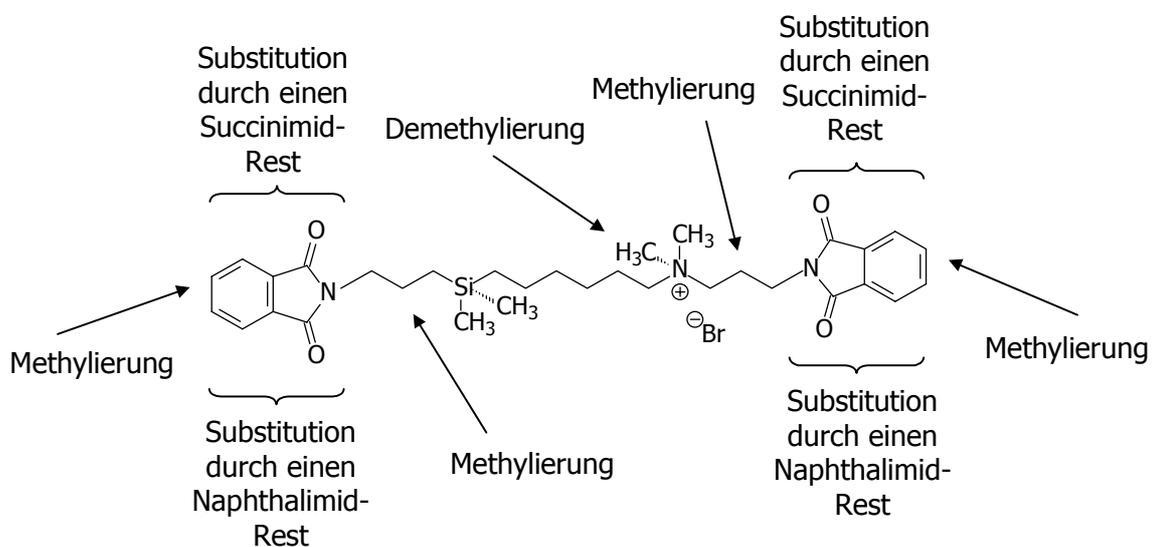


Abbildung 4.1: Strukturvariationen von TD2, die einzeln oder kombiniert zu den innerhalb dieser Arbeit untersuchten Silizium-haltigen Modulatoren geführt haben.

4.1.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen an [3H]NMS-besetzten M_2 -Rezeptoren

Die Veränderungen der Affinität Silizium-haltiger Verbindungen zu Antagonist-besetzten M_2 -Rezeptoren, die durch die Strukturvariationen erzielt wurden, fallen zumeist recht gering aus. Abbildung 4.2 zeigt die $pEC_{0,5diss}$ -Werte aller untersuchten Silizium-haltigen Verbindungen in Form eines Säulendiagramms.

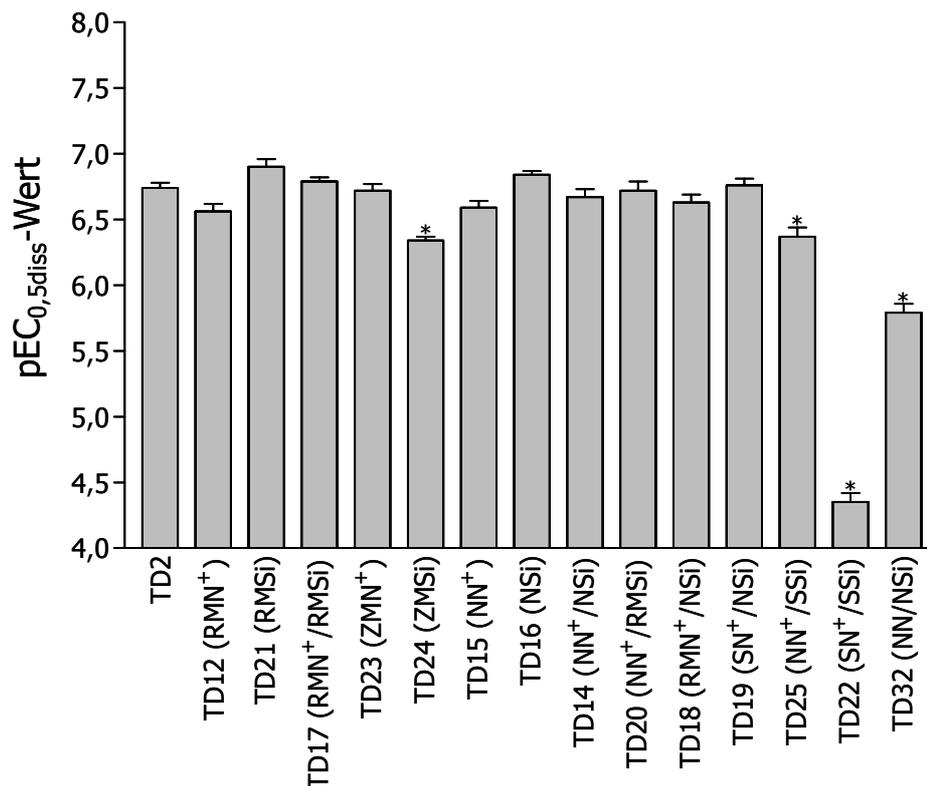


Abbildung 4.2: Affinitäten der innerhalb dieser Arbeit untersuchten Silizium-haltigen Modulatoren zu [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37°C. *Ordinate:* Affinität der Testsubstanzen ausgedrückt durch pEC_{0,5diss}-Werte, d.h. die negativen dekadischen Logarithmen der halbmaximal wirksamen Konzentrationen zur Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation; *Abszisse:* Bezeichnungen der Testsubstanzen und im Vergleich zu TD2 vorgenommene strukturelle Modifikation(en) (in Klammern). RMN⁺ bzw. RMSi: Laterale Ring-Methylierung auf der Ammonium- bzw. Silizium-Seite; ZMN⁺ bzw. ZMSi: Zwischenketten-Methylierung auf der Ammonium- bzw. Silizium-Seite; NN⁺ bzw. NSi: Naphthalimid-Einführung auf der Ammonium- bzw. Silizium-Seite; SN⁺ bzw. SSi: Succinimid-Einführung auf der Ammonium- bzw. Silizium-Seite; NN: Naphthalimid-Einführung auf der Seite des tertiären Amins. *: Signifikanter Unterschied des betreffenden pEC_{0,5diss}-Wertes zu demjenigen von TD2 (ungepaarter t-Test). Falls zwei Veränderungen zugleich vorgenommen wurden, sind diese durch einen Schrägstrich getrennt angegeben.

Die Affinität der untersuchten Silizium-haltigen Verbindungen zu [³H]NMS-besetzten Rezeptoren bleibt weitgehend unverändert, solange der quartäre Stickstoff und zumindest ein endständiger aromatischer Substituent erhalten bleiben. Ein deutlicher Affinitätsverlust von annähernd 0,9 Dekaden resultiert hingegen aus dem Austausch des quartären Stickstoffes von TD14 durch einen tertiären Stickstoff in TD32. Da ungeladene Silizium-haltige Substanzen wohl keine nennenswerte Affinität zu [³H]NMS-besetzten Rezeptoren besitzen (vergleiche 1.4), ist ein permanent positiv geladener quartärer Stickstoff für die Rezeptor-Interaktion offenbar am günstigsten. Noch ausgeprägter wirkt sich die beidseitige Substitution

der Phthalimid-Reste von TD2 durch ein nichtaromatisches Succinimid (TD22) auf den $pEC_{0,5diss}$ -Wert aus, die Affinitätsdifferenz beträgt hier etwa 2,4 Dekaden.

Die vorliegenden Befunde zeigen, dass für die hochaffine Bindung der Silizium-haltigen Modulatoren an $[^3H]$ NMS-besetzten Rezeptoren mindestens eine endständige aromatische Gruppe erforderlich ist. Dabei spielt es eine Rolle, ob sich der verbliebene aromatische Rest auf der Silizium- (TD19) oder Ammonium-Seite (TD25) befindet. Im ersteren Fall bleibt die Affinität gegenüber TD2 unverändert ($p = 0,59$), im letzteren fällt sie signifikant um 0,4 Dekaden ab ($p = 0,01$), so dass sich für eine hohe Affinität der aromatische Rest auf der Silizium-Seite befinden muss.

Die Art der aromatischen Gruppe hingegen hat im Vergleich zu TD2 vermutlich keinen Einfluss auf die Modulator-Affinität. Eine ein- wie auch eine beidseitige Substitution der Phthalimid-Reste von TD2 durch Methylphthalimid (TD12, TD17 und TD21) oder durch Naphthalimid (TD14, TD15 und TD16) zieht nur leichte, statistisch nicht signifikante Verschiebungen des $pEC_{0,5diss}$ -Wertes nach sich (siehe auch Tabelle 7.1). Allerdings scheinen diese Affinitäts-Veränderungen systematisch zu sein, solange eine Phthalimid-Gruppe erhalten bleibt. TD21 und TD16 besitzen auf der Silizium-Seite mit Methylphthalimid bzw. Naphthalimid einen Substituenten, der größer als der Phthalimid-Rest auf der Ammonium-Seite ist. Im Vergleich zu TD12 bzw. TD15, bei denen sich der größere laterale Rest jeweils auf der Ammonium-Seite befindet, ist der $pEC_{0,5diss}$ -Wert von TD21 und TD16 signifikant höher (siehe auch Tabelle 7.1). Die Effekte, die sich aus der einseitigen Modifikation der Phthalimid-Gruppen von TD2 ergeben, scheinen somit einem einheitlichen Muster zu folgen.

4.1.2 Struktur-Wirkungs-Beziehungen an freien M_2 -Rezeptoren

Die Auswirkungen der vorgenommenen Strukturmodifikationen auf die Affinität der Silizium-haltigen Verbindungen zu freien M_2 -Rezeptoren sind sehr unterschiedlich, der Unterschied gegenüber TD2 ist jedoch nur selten signifikant. Darüber hinaus ist eine Systematik zumeist nicht erkennbar. Abbildung 4.3 belegt dies durch Gegenüberstellung aller innerhalb dieser Arbeit ermittelten pK_A -Werte.

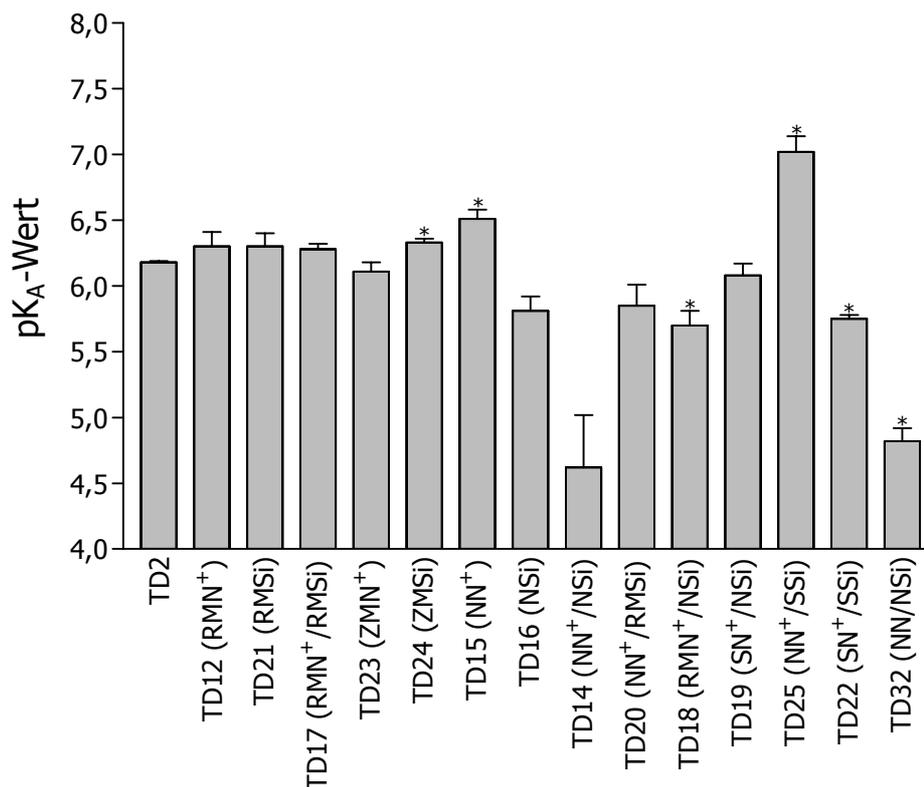


Abbildung 4.3: Affinitäten der innerhalb dieser Arbeit untersuchten Silizium-haltigen Modulatoren zu freien M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37°C. *Ordinate:* Affinität der Testsubstanzen ausgedrückt durch den pK_A-Wert, d.h. den negativen dekadischen Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten für die Bindung an freien Rezeptoren; *Abszisse:* Bezeichnungen der Testsubstanzen und im Vergleich zu TD2 vorgenommene strukturelle Modifikation(en) (in Klammern). RMN⁺ bzw. RMSi: Laterale Ring-Methylierung auf der Ammonium- bzw. Silizium-Seite; ZMN⁺ bzw. ZMSi: Zwischenketten-Methylierung auf der Ammonium- bzw. Silizium-Seite; NN⁺ bzw. NSi: Naphthalimid-Einführung auf der Ammonium- bzw. Silizium-Seite; SN⁺ bzw. SSi: Succinimid-Einführung auf der Ammonium- bzw. Silizium-Seite; NN: Naphthalimid-Einführung auf der Seite des tertiärenamins. *: Signifikanter Unterschied des betreffenden pK_A-Wertes zu demjenigen von TD2 (ungepaarter t-Test). Falls zwei Veränderungen zugleich vorgenommen wurden, sind diese durch einen Schrägstrich getrennt angegeben.

Eine ein- (TD12 und TD21) oder beidseitige laterale Methylierung (TD17) von TD2 hat keinen Einfluss auf die Modulator-Affinität zu freien Rezeptoren (siehe auch Tabelle 7.2). Dies gilt in ähnlicher Weise auch für die beiden untersuchten Formen der Methylierung der Propyl-Zwischenkette (TD23 und TD24). Der pK_A-Wert von TD24 ist gegenüber TD2 zwar signifikant erhöht ($p < 0,01$), aber der Affinitätsunterschied beträgt zwischen beiden Verbindungen nur etwa 0,2 Dekaden. Aus der Substitution der Naphthalimid-Gruppe der Silizium-Seite in TD14 durch Phthalimid (TD15), Methylphthalimid (TD20), oder durch Succinimid (TD25) ergibt sich in allen drei Fällen eine signifikante Zunahme des pK_A-Wertes (siehe auch Tabelle 7.2).

Diese Befunde lassen daher den Schluss zu, dass die Einführung eines im Vergleich zu Naphthalimid kleineren Restes die Interaktion mit freien M_2 -Rezeptoren erleichtert.

Im Gegensatz dazu hat der Austausch des Naphthalimid-Substituenten der Ammonium-Seite in TD14 durch Phthalimid (TD16), Methylphthalimid (TD18) oder Succinimid (TD19) jeweils keinen signifikanten Einfluss auf den pK_A -Wert (siehe auch Tabelle 7.2). Es kann daher vermutet werden, dass die Interaktion mit freien M_2 -Rezeptoren ohne Beteiligung dieses Molekülandes zustande kommt.

Der Austausch des quartären Stickstoffes (TD14) durch einen tertiären (TD32) verändert den pK_A -Wert nicht signifikant ($p = 0,65$). Für die Interaktion der Silizium-haltigen Verbindungen mit freien M_2 -Rezeptoren ist es daher vermutlich ohne Bedeutung, ob eine permanente oder eine temporäre Positiv-Ladung vorliegt.

4.1.3 Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Kooperativität mit [3H]NMS

Die Kooperativität einer Substanz ist ein abgeleiteter Parameter, der von dessen Affinität an besetzten und freien Rezeptoren abhängt. So ist eine Erhöhung des $p\alpha$ -Wertes entweder durch den Anstieg des $pEC_{0,5diss}$ -Wertes oder eine Absenkung des pK_A -Wertes möglich. In die Betrachtung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Kooperativität mit [3H]NMS sollen daher, soweit möglich, die in 4.1.1 bzw. 4.1.2 diskutierten Aspekte miteinbezogen werden. Abbildung 4.4, die sämtliche im Zuge dieser Arbeit ermittelten $p\alpha$ -Werte gegenüberstellt, fasst den Einfluss der verschiedenen Strukturmodifikationen auf die [3H]NMS-Bindung zusammen.

Die allermeisten untersuchten Silizium-haltigen Verbindungen verhalten sich positiv kooperativ gegenüber [3H]NMS. Diese Modulatoren sind sehr unterschiedlich aufgebaut, haben jedoch als gemeinsames Strukturelement einen aromatischen Substituenten auf der Silizium-Seite, der für die Bindungsförderung offenbar essentiell ist. Sobald an dieser Position ein nichtaromatisches Succinimid eingeführt wird, kehrt sich die Kooperativität in den negativen Bereich um (TD22 und TD25), wobei es offenbar ohne Bedeutung ist, welcher Rest auf der Ammonium-Seite vorliegt.

Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Kooperativitätsumkehr auf eine Erhöhung der Affinität zu freien Rezeptoren zurückzuführen ist. So kommt es jeweils zu einer deutlichen Zunahme des pK_A -Wertes, wenn der Phthalimid-Rest von TD15, der Methylphthalimid-Rest von TD20 oder der Naphthalimid-Rest der Silizium-Seite von TD14 durch Succinimid (TD25) ersetzt wird.

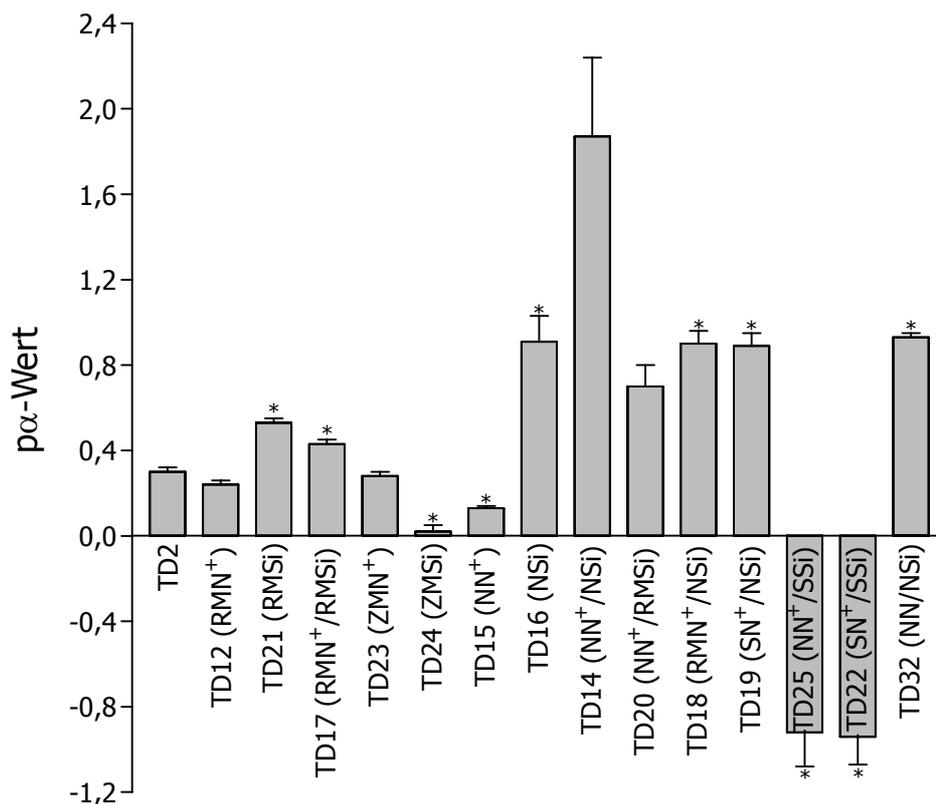


Abbildung 4.4: Beeinflussung der [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung durch sämtliche im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Silizium-haltigen Modulatoren an M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37°C. *Ordinate:* Einfluss der Testsubstanzen auf das Bindungsgleichgewicht des Orthosters [³H]NMS ausgedrückt durch den negativen dekadischen Logarithmus des Kooperativitätsfaktors; *Abszisse:* Bezeichnungen der Testsubstanzen und im Vergleich zu TD2 vorgenommene strukturelle Modifikation(en) (in Klammern). RMN⁺ bzw. RMSi: Laterale Ring-Methylierung auf der Ammonium- bzw. Silizium-Seite; ZMN⁺ bzw. ZMSi: Zwischenketten-Methylierung auf der Ammonium- bzw. Silizium-Seite; NN⁺ bzw. NSi: Naphthalimid-Einführung auf der Ammonium- bzw. Silizium-Seite; SN⁺ bzw. SSi: Succinimid-Einführung auf der Ammonium- bzw. Silizium-Seite; NN: Naphthalimid-Einführung auf der Seite des tertiärenamins. *: Signifikanter Unterschied des betreffenden $p\alpha$ -Wertes zu demjenigen von TD2 (ungepaarter t-Test). Falls zwei Veränderungen zugleich vorgenommen wurden, sind diese durch einen Schrägstrich getrennt angegeben.

Unabhängig von der Einführung des Succinimid-Substituenten scheint es für die Auswirkungen struktureller Modifikation auf die Kooperativität von entscheidender

Bedeutung zu sein, an welchem Moleküle sie durchgeführt werden. Die Variation der Ammonium-Seite hat zumeist keinen Einfluss auf den $p\alpha$ -Wert. TD14, TD16, TD18 und TD19 enthalten an dieser Seite unterschiedliche Reste (Naphthalimid, Phthalimid, Methylphthalimid bzw. Succinimid), ihre Kooperativitäten unterscheiden sich jedoch nicht signifikant voneinander (siehe auch Tabelle 7.3). Darüber hinaus bleibt die Kooperativität in ähnlichem Ausmaß erhalten, wenn die Phthalimid-Gruppe der Ammonium-Seite von TD2 durch Methylphthalimid (TD12) oder durch Naphthalimid (TD15) substituiert wird.

Demgegenüber zeigt sich für die Veränderung der Silizium-Seite ein völlig anderes Bild. Die Effekte von TD14, TD15, TD20 und TD25, die mit Naphthalimid, Phthalimid, Methylphthalimid und Succinimid verschiedene Substituenten tragen, auf die [^3H]NMS-Gleichgewichtsbindung sind sehr unterschiedlich (siehe auch Tabelle 7.3). Dafür sind die ausgeprägten Affinitäts-Differenzen zu freien Rezeptoren verantwortlich (siehe Abbildung 4.3). Zudem resultiert aus der Substitution des Phthalimid-Restes des Silizium-Seite von TD2 durch Naphthalimid (TD16) oder Methylphthalimid (TD21) eine signifikante Erhöhung des $p\alpha$ -Wertes.

Die Demethylierung des quartären Stickstoff-Atoms von TD14 (TD32) hat keinen Einfluss auf die Kooperativität mit [^3H]NMS, ein signifikanter Unterschied zwischen den $p\alpha$ -Werten beider Modulatoren besteht nicht ($p = 0,13$).

4.2 Vergleich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Silizium-haltigen Verbindungen mit denen strukturell nahestehender Modulatoren

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Gruppe von Testsubstanzen ist strukturell eng verwandt mit zwei anderen Klassen von allosterischen Modulatoren. An erster Stelle sind die vor dem Hintergrund vielzähliger Fragestellungen sehr detailliert untersuchten Hexan-Bisammonium-Verbindungen als wichtigste Vertreter der Alkan-Bisammonium-Modulatoren zu nennen. Aus diesen sind die innerhalb der vorliegenden Arbeit eingesetzten Substanzen durch singulären N^+/Si -Austausch hervorgegangen. Darüber hinaus gibt es eine weitere Gruppe von Silizium-haltigen

Modulatoren, die im zentralen Bereich des Moleküls eine Pentyl- statt einer Hexyl-Kette enthalten. Das allosterische Verhalten dieser Verbindungen wurden von Duda-Johner (2002) eingehend untersucht. Die Struktur-Wirkungs-Beziehungen dieser drei Modulator-Gruppen sollen nachfolgend miteinander verglichen werden.

4.2.1 Bedeutung der Kettenlänge für die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Silizium-haltigen Modulatoren

Bei beiden Gruppen von Silizium-haltigen Verbindungen findet sich ein Vertreter, der zwei endständige Phthalimid-Reste enthält (TD2 bzw. W84-Si_{1/5} in Duda-Johner, 2002). Diese Ausgangsverbindungen wurden jeweils schrittweise durch Austausch der Phthalimid-Gruppen durch Naphthalimid verändert. Die Abbildungen 4.5, 4.6 und 4.7 vergleichen die Auswirkungen dieser Strukturmodifikationen auf die Affinität zu [³H]NMS-besetzten bzw. freien Rezeptoren sowie die Kooperativität mit [³H]NMS miteinander.

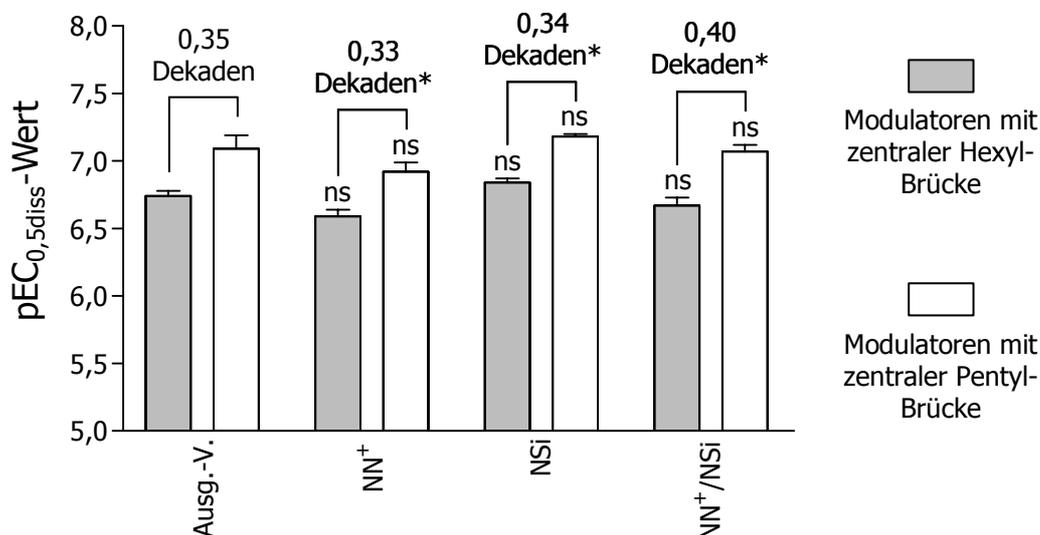


Abbildung 4.5: Affinitäten ausgewählter Silizium-haltiger Modulatoren mit zentraler Hexyl- (diese Arbeit) oder Pentyl-Brücke (Duda-Johner, 2002) zu [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptoren des Hauschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37°C. Die [³H]NMS-Konzentration betrug in allen Fällen 0,2 nM. *Ordinate:* Affinität der Testsubstanzen ausgedrückt durch pEC_{0,5diss}-Werte; *Abszisse:* Vorgenommene strukturelle Modifikation(en). Ausg.-V.: Ausgangsverbindung mit zwei lateralen Phthalimid-Resten; NN⁺ bzw. NSi: Naphthalimid-Einführung auf der Ammonium- oder der Silizium-Seite; NN⁺/NSi: Naphthalimid-Einführung auf der Ammonium- und der Silizium-Seite. ^{ns}: Nicht signifikanter Unterschied des betreffenden pEC_{0,5diss}-Wertes zu demjenigen der Ausgangsverbindung (ungepaarter t-Test). *: Signifikanter Unterschied zwischen den pEC_{0,5diss}-Werten der betreffenden homologen Verbindungen (ungepaarter t-Test).

4.2 Vergleich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Silizium-haltigen Verbindungen mit denen strukturell nahestehender Modulatoren

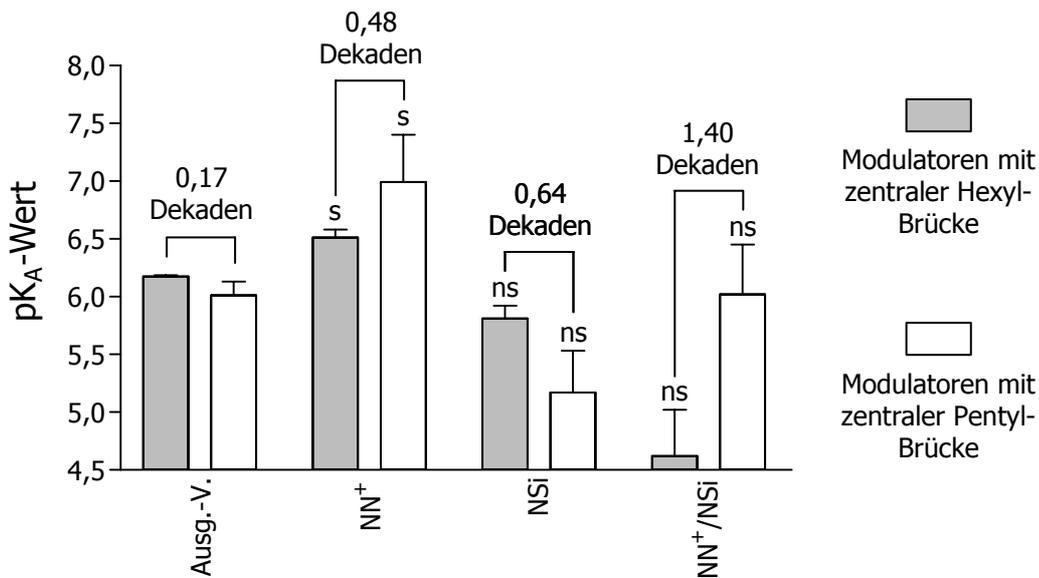


Abbildung 4.6: Affinitäten ausgewählter Silizium-haltiger Modulatoren mit zentraler Hexyl- (diese Arbeit) oder Pentyl-Brücke (Duda-Johner, 2002) zu freien M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37°C. Die [³H]NMS-Konzentration betrug in allen Fällen 0,2 nM. *Ordinate:* Affinität der Testsubstanzen ausgedrückt durch pK_A-Werte; *Abszisse:* Vorgenommene strukturelle Modifikation(en). Ausg.-V.: Ausgangsverbindung mit zwei lateralen Phthalimid-Resten; NN⁺ bzw. NSi: Naphthalimid-Einführung auf der Ammonium- oder der Silizium-Seite; NN⁺/NSi: Naphthalimid-Einführung auf der Ammonium- und der Silizium-Seite. ^{s/ns}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied des betreffenden pK_A-Wertes zu demjenigen der Ausgangsverbindung (ungepaarter t-Test). Bei allen vier Paaren von homologen Verbindungen besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden pK_A-Werten (ungepaarter t-Test).

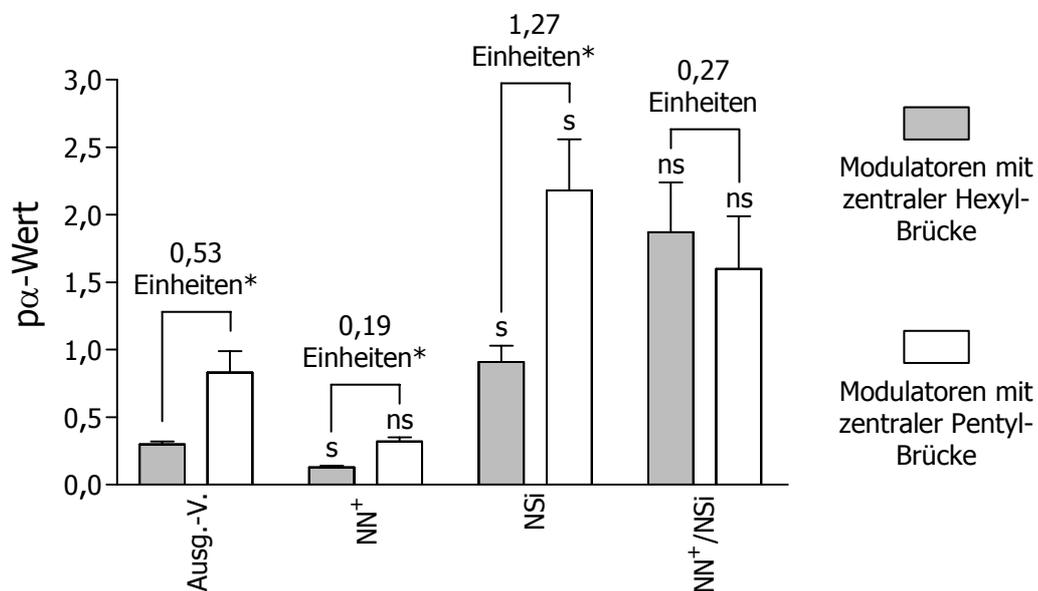


Abbildung 4.7: Beeinflussung der [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung durch ausgewählte Silizium-haltige Modulatoren mit zentraler Hexyl- (diese Arbeit) oder Pentyl-Brücke (Duda-Johner, 2002) an M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37°C. Die [³H]NMS-Konzentration betrug in allen Fällen 0,2 nM. *Ordinate:* Einfluss der Testsubstanzen auf das Bindungsgleichgewicht des Orthosters [³H]NMS ausgedrückt durch den negativen dekadischen Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α; *Abszisse:* Vorgenommene strukturelle Modifikation(en). Ausg.-V.: Ausgangsverbindung mit zwei lateralen Phthalimid-Resten; NN⁺ bzw. NSi: Naphthalimid-Einführung auf der Ammonium- oder der Silizium-Seite; NN⁺/NSi: Naphthalimid-Einführung auf der Ammonium- und der Silizium-Seite. ^{s/ns}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied des betreffenden pα-Wertes zu demjenigen der Ausgangsverbindung (ungepaarter t-Test). *: Signifikanter Unterschied zwischen den pα-Werten der beiden homologen Verbindungen (ungepaarter t-Test).

Beide Gruppen von Silizium-haltigen Verbindungen weisen parallele Struktur-Wirkungs-Beziehungen bezüglich der Affinität zu [³H]NMS-besetzten Rezeptoren auf. Der Unterschied der pEC_{0,5diss}-Werte zwischen beiden Ausgangsverbindungen beträgt 0,35 Dekaden (siehe Abbildung 4.5) und bleibt trotz ein- oder zweifacher Naphthalimid-Substitution nahezu unverändert bestehen.

Die ein- oder zweifache Einführung eines Naphthalimid-Substituenten hat auch für die Affinität der beiden Gruppen von Silizium-haltigen Verbindungen zu freien Rezeptoren identische Auswirkungen (siehe Abbildung 4.6). Der höchste pK_A-Wert kann jeweils durch Variation der Ammonium-Seite erreicht werden, der Affinitäts-Gewinn gegenüber der Ausgangsverbindung ist für beide Modulator-Gruppen signifikant. Der Austausch der Phthalimid-Gruppe auf der Silizium-Seite der Ausgangsverbindung durch Naphthalimid hingegen hat jeweils keinen Einfluss auf den pK_A-Wert, dies gilt auch, wenn in diesen Mono-Naphthalimid-Derivaten zusätzlich der verbliebene Phthalimid-Rest auf der Ammonium-Seite durch Naphthalimid ersetzt wird.

Die Auswirkungen der strukturellen Modifikation hinsichtlich der Kooperativität mit [³H]NMS sind für beide Gruppen von Substanzen recht ähnlich (siehe Abbildung 4.7). Aus der einseitigen Variation der Silizium-Seite resultiert jeweils eine signifikante Erhöhung des p α -Wertes gegenüber der Ausgangsverbindung. Dieser Kooperativitäts-Gewinn geht in beiden Fällen wieder verloren, wenn zusätzlich die Ammonium-Seite modifiziert wird. Die einseitige Naphthalimid-Substitution am Ammonium-Ende der Ausgangsverbindung hat hingegen unterschiedliche Auswirkungen. Bei den Verbindungen mit einer Pentyl-Brücke bleibt der p α -Wert statistisch unverändert, während er bei den längerkettigen Substanzen signifikant abnimmt. Allerdings fällt dieser Verlust mit weniger als 0,2 Einheiten sehr gering aus.

4.2.2 Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Silizium-haltigen Modulatoren im Vergleich zu analogen Alkan-Bisammonium-Substanzen

Die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Substanzen vom Hexan-Bisammonium-Typ sind gut bekannt (z.B. Kostenis et al., 1994; Staudt et al., 1998; Nassif-Makki et al., 1999; Bender et al., 2000; Botero Cid et al., 2000; Holzgrabe et al., 2000; Li

et al., 2001; Balatkova, 2002; Raasch et al., 2002; Gilsbach et al., 2003; Mohr et al., 2003; Muth et al., 2003; Muth et al., 2005), was einen Vergleich mit den Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Silizium-haltigen Verbindungen erlaubt.

4.2.2.1 Einfluss lateraler Molekülvariationen

Die Abbildungen 4.8, 4.9 und 4.10 veranschaulichen für beide Modulator-Klassen die Veränderungen des $pEC_{0,5diss^-}$, pK_A - und $p\alpha$ -Wertes infolge einer ein- oder beidseitigen Substitution der Phthalimid-Gruppe in TD2 bzw. W84 durch einen Methylphthalimid- oder Naphthalimid-Rest.

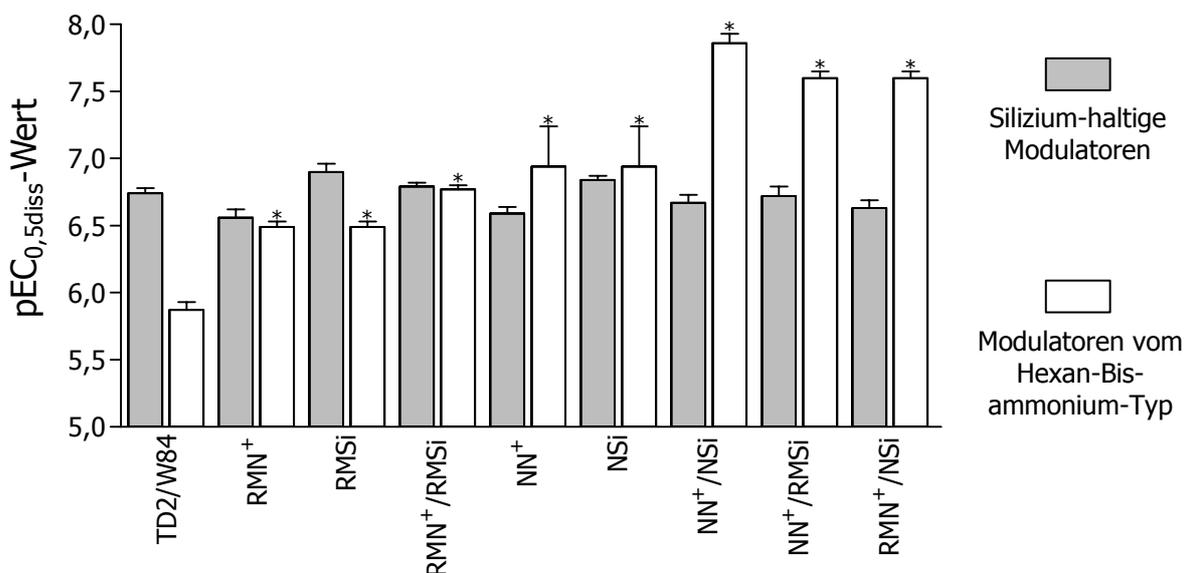


Abbildung 4.8: Affinitäten ausgewählter Silizium-haltiger Modulatoren (diese Arbeit) bzw. Silizium-freier Analog-Verbindungen (Muth et al., 2003) zu $[^3H]$ NMS-besetzten M_2 -Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37°C. Die $[^3H]$ NMS-Konzentration betrug in allen Fällen 0,2 nM. *Ordinate:* Affinität der Testsubstanzen ausgedrückt durch $pEC_{0,5diss^-}$ -Werte; *Abszisse:* Vorgenommene strukturelle Modifikation(en) der Silizium-haltigen Verbindungen. RMN⁺ bzw. RMSi: Laterale Ring-Methylierung der Ammonium- bzw. Silizium-Seite; NN⁺ bzw. NSi: Naphthalimid-Einführung auf der Ammonium- bzw. Silizium-Seite. Falls zwei Veränderungen zugleich am Ausgangsmolekül vorgenommen wurden, sind diese durch einen Schrägstrich getrennt angegeben. Im Gegensatz zu den Silizium-haltigen Verbindungen sind die Hexan-Bis-ammonium-Modulatoren symmetrisch aufgebaut, daher kann bei einseitigen Variationen nicht zwischen zwei verschiedenen Fällen differenziert werden. *: Signifikanter Unterschied des betreffenden $pEC_{0,5diss^-}$ -Wertes zu demjenigen von TD2 bzw. W84 (ungepaarter t-Test).

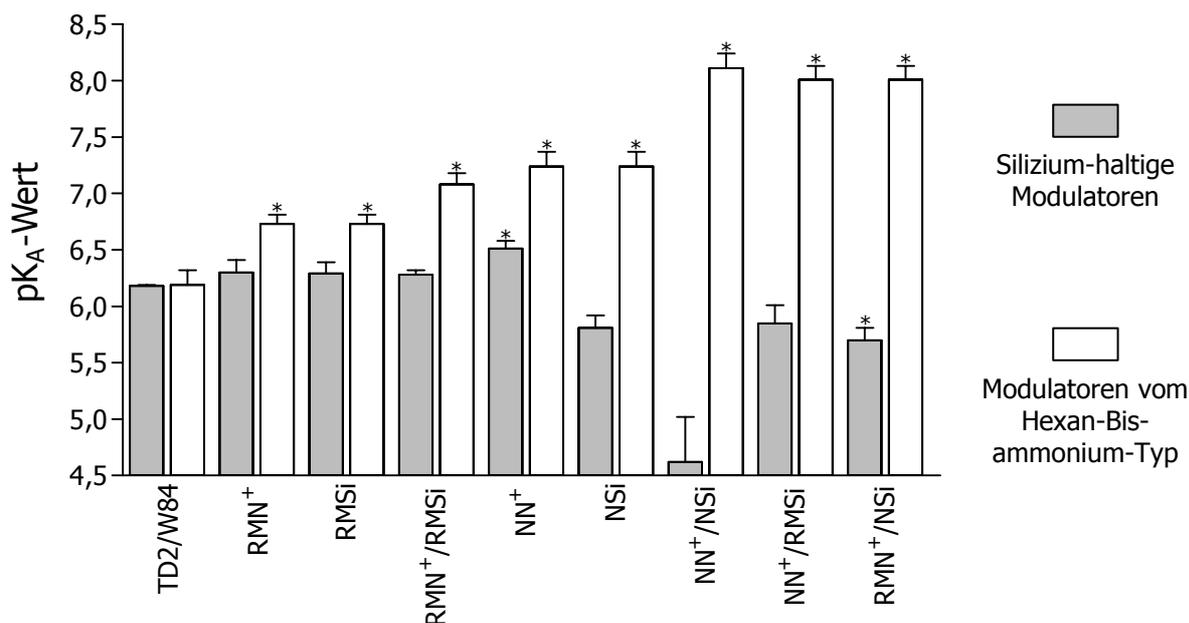


Abbildung 4.9: Affinitäten ausgewählter Silizium-haltiger Modulatoren (diese Arbeit) bzw. Silizium-freier Analog-Verbindungen (Muth et al., 2003) zu freien M₂-Rezeptoren des Hausschweinerzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37°C. Die [³H]NMS-Konzentration betrug in allen Fällen 0,2 nM. *Ordinate:* Affinität der Testsubstanzen ausgedrückt durch pK_A-Werte; *Abszisse:* Vorgenommene strukturelle Modifikation(en) der Silizium-haltigen Verbindungen. RMN⁺ bzw. RMSi: Laterale Ring-Methylierung der Ammonium- bzw. Silizium-Seite; NN⁺ bzw. NSi: Naphthalimid-Einführung auf der Ammonium- bzw. Silizium-Seite. Falls zwei Veränderungen zugleich am Ausgangsmolekül vorgenommen wurden, sind diese durch einen Schrägstrich getrennt angegeben. Im Gegensatz zu den Silizium-haltigen Verbindungen sind die Hexan-Bisammonium-Modulatoren symmetrisch aufgebaut, daher kann bei einseitigen Variationen nicht zwischen zwei verschiedenen Fällen differenziert werden. *: Signifikanter Unterschied des betreffenden pK_A-Wertes zu demjenigen von TD2 bzw. W84 (ungepaarter t-Test).

Die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Silizium-haltigen Modulatoren unterscheiden sich bezüglich aller drei Parameter deutlich von denen der Alkan-Bisammonium-Verbindungen. Während die betrachteten Strukturmodifikationen keinen Einfluss auf die Affinität der Silizium-haltigen Substanzen zu [³H]NMS-besetzten Rezeptoren haben, resultiert aus jeder Variation von W84 ein signifikanter Affinitäts-Gewinn, wobei der pEC_{0,5diss}-Wert mit der Größe des lateralen Restes korreliert (siehe Abbildung 4.8).

Ein ähnliches Bild ergibt sich für die Alkan-Bisammonium-Substanzen bezüglich des pK_A-Wertes. Auch dort führt jede Form der Variation zu einer signifikanten Affinitäts-Zunahme, die umso ausgeprägter ist, je mehr der Modulator durch die Lateralmodifikation vergrößert wird (siehe Abbildung 4.9). Im Gegensatz dazu findet sich bei den Silizium-haltigen Verbindungen kein einheitliches Muster, tenden-

tiell scheint der pK_A -Wert jedoch mit zunehmendem Modulator-Volumen abzunehmen.

Sämtliche hier betrachteten Alkan-Bisammonium-Verbindungen verhalten sich gegenüber $[^3H]NMS$ negativ kooperativ, zudem ist der $p\alpha$ -Wert ungeachtet der strukturellen Variationen von W84 weitgehend unverändert geblieben (siehe Abbildung 4.10). Die zum Vergleich herangezogenen Silizium-haltigen Substanzen sind hingegen allesamt positiv kooperativ und die meisten Strukturveränderungen, die ausgehend von TD2 vorgenommen wurden, haben einen ausgeprägten Einfluss auf die Kooperativität mit $[^3H]NMS$.

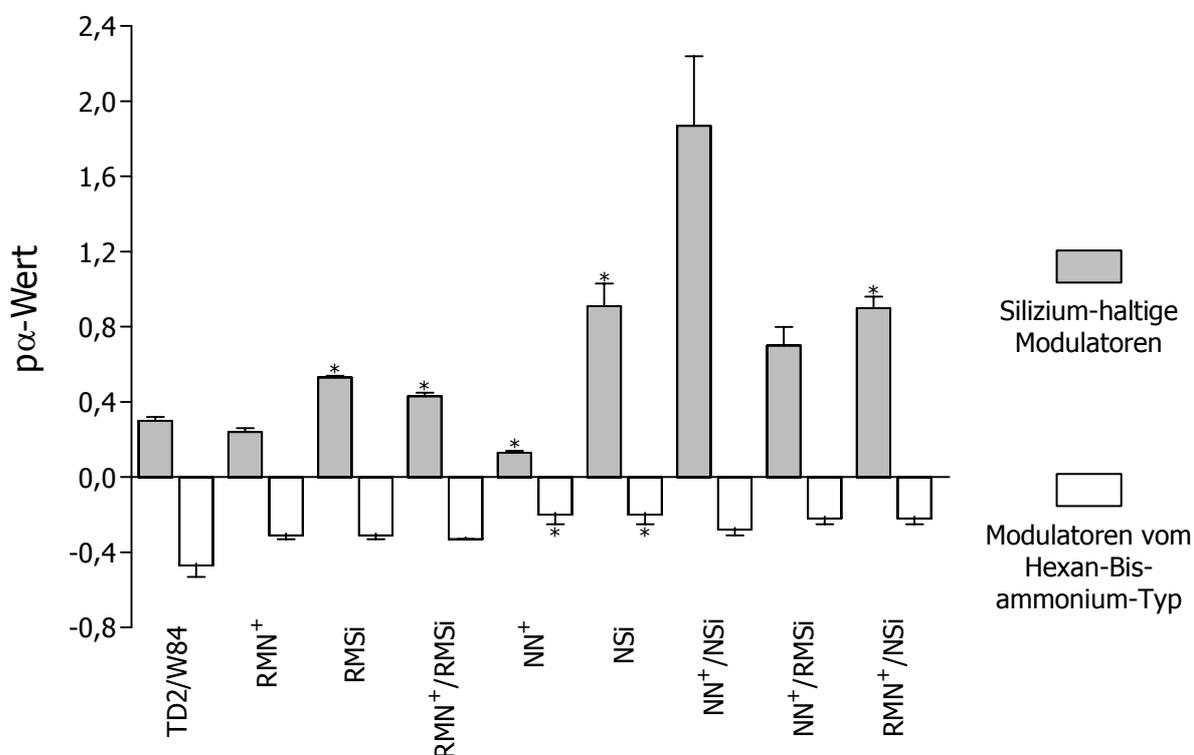


Abbildung 4.10: Beeinflussung der $[^3H]NMS$ -Gleichgewichtsbindung durch ausgewählte Silizium-haltiger Modulatoren (diese Arbeit) bzw. Silizium-freie Analog-Verbindungen (Muth et al., 2003) an M_2 -Rezeptoren des Hausschwein-Herzens in Mg-Phosphat-Tris-Puffer in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bei pH 7,3 und 37°C. Die $[^3H]NMS$ -Konzentration betrug in allen Fällen 0,2 nM. *Ordinate:* Einfluss der Testsubstanzen auf das Bindungsgleichgewicht des Orthosters $[^3H]NMS$ ausgedrückt durch den negativen dekadischen Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α ; *Abszisse:* Vorgenommene strukturelle Modifikation(en) der Silizium-haltigen Verbindungen. RMN⁺ bzw. RMSi: Laterale Ring-Methylierung der Ammonium- bzw. Silizium-Seite; NN⁺ bzw. NSi: Naphthalimid-Einführung auf der Ammonium- bzw. Silizium-Seite. Falls zwei Veränderungen zugleich am Ausgangsmolekül vorgenommen wurden, sind diese durch einen Schrägstrich getrennt angegeben. Im Gegensatz zu den Silizium-haltigen Verbindungen sind die Hexan-Bisammonium-Modulatoren symmetrisch aufgebaut, daher kann bei einseitigen Variationen nicht zwischen zwei verschiedenen Fällen differenziert werden. Für das W84-Derivat, welches beidseitig lateral ringmethyliert ist, wurde in der Literatur kein Standardfehler genannt. *: Signifikanter Unterschied des betreffenden $p\alpha$ -Wertes zu demjenigen von TD2 bzw. W84 (ungepaarter t-Test).

Vor dem Hintergrund einer einseitigen Succinimid-Substitution ergibt sich ein weiterer Unterschied zwischen den Silizium-haltigen Verbindungen und den Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ. Wird in TD14 ein Naphthalimid-Rest durch Succinimid ersetzt, bleibt der $pEC_{0,5diss}$ -Wert unverändert (TD19) oder nimmt mit rund 0,3 Dekaden leicht ab (TD25). Demgegenüber führt die Substitution einer Phthalimid-Gruppe von W84 durch Succinimid zu einem deutlichen Affinitätsverlust von etwa einer Dekade (Bender et al., 2000). Auch wenn diese Modulatoren neben Succinimid einen unterschiedlichen lateralen Rest enthalten (Naphthalimid bei den Silizium-haltigen Verbindungen bzw. Phthalimid bei der Alkan-Bisammonium-Substanz), kann dennoch von abweichenden Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen beiden Modulator-Klassen gesprochen werden, da der $pEC_{0,5diss}$ -Wert der Silizium-haltigen Verbindungen unabhängig von der Art des aromatischen Restes ist (siehe 4.1.1).

Während Kostenis et al. (1994) und Voigtländer et al. (2003) vermuten, dass das gesamte W84-Molekül mit dem $[^3H]$ NMS-besetzten M_2 -Rezeptor in Wechselwirkung tritt, trifft dies für die Silizium-haltigen Verbindungen vermutlich nicht zu. Durch die verschiedenen Formen der einseitigen Substitution in TD2 wird der $pEC_{0,5diss}$ -Wert nicht wesentlich verändert (siehe Abbildung 4.2), so dass das derivatisierte Moleküle für Interaktion mit dem Rezeptorprotein anscheinend nicht von Bedeutung ist. Es wäre interessant, einseitig verkürzte Silizium-haltige Modulatoren zu untersuchen, bei denen die laterale Gruppe oder zusätzlich die angrenzende Propyl-Kette entfernt wurde. Wenn die Affinität erneut nur geringfügig geändert würde, könnte eine Analogie zum Bispyridinium-Derivat Duo3 angenommen werden. Für diesen Modulator wurde postuliert, dass die Interaktion mit $[^3H]$ NMS-besetzten M_2 -Rezeptoren nur etwa die Hälfte des Molekülgerüsts erfordert (Kostenis et al., 1994).

4.2.2.2 Einfluss verschiedener Zentralketten-Längen

In der Literatur findet sich sowohl für die Silizium-haltigen Substanzen als auch für die Alkan-Bisammonium-Verbindungen eine Arbeit, in der die Abhängigkeit der Affinität zu $[^3H]$ NMS-besetzten M_2 -Rezeptoren von der Länge des Modulators

gerkettigen Modulatoren ist hingegen zumeist signifikant vermindert. Bei den Verbindungen vom Alkan-Bisammonium-Typ besitzt das Heptan-Derivat mit einem Abstand zwischen beiden quartären Stickstoffen von etwa 10,3 Å die größte Affinität. Die Verkürzung der Zentralkette führt in allen Fällen zu einem signifikanten Affinitäts-Verlust, wohingegen eine Verlängerung keinen Einfluss auf den $pEC_{0,5diss}$ -Wert hat.

Neben der für die Affinität optimalen Kettenlänge unterscheiden sich somit auch die Struktur-Wirkungs-Beziehungen beider Modulator-Gruppen deutlich voneinander. Ausgehend vom Vertreter mit dem höchsten $pEC_{0,5diss}$ -Wert scheint bei den TD2-artigen Substanzen eine Verlängerung der Zentralkette die Wechselwirkung mit dem Rezeptor zu stören. Für die W84-Derivate sind die Verhältnisse umgekehrt, dort wirkt sich die Verkürzung affinitätsvermindernd aus.

Die Silizium-haltigen Verbindungen nehmen bezüglich der für die Affinität zu [3H]NMS-besetzten Rezeptoren optimalen Kettenlänge gegenüber strukturell ähnlichen Modulator-Klassen offenbar eine Sonderstellung ein. Neben den Alkan-Bisammonium-Verbindungen wurden in der Arbeit von Nassif-Makki et al. (1999) zwei weitere Gruppen von homologen Substanzen auf ihre Affinität an [3H]NMS-besetzten M_2 -Rezeptoren untersucht. Es handelt sich dabei um Vertreter der WDuo- bzw. IWDuo-Reihe, die ebenfalls eine lineare Struktur, zwei permanente Positiv-Ladungen sowie zwei endständige Phthalimid-Gruppen aufweisen. Auch bei diesen Modulator-Klassen beträgt der Abstand zwischen den beiden Ladungen bei den Vertretern mit der höchsten Affinität annähernd 10 Å. Dies deckt sich gut mit dem Heptan-Analogon von W84, weicht aber deutlich von dem potentesten Silizium-haltigen Modulator ab.

4.3 Bedeutung der Zusammensetzung des Inkubationspuffers für die Affinität der Silizium-haltigen Modulatoren an [3H]NMS-besetzten M_2 -Rezeptoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die $pEC_{0,5diss}$ -Werte der Modulatoren W84, TD2, TD14, TD15, TD16 und TD32 an [3H]NMS-besetzten M_2 -Rezeptoren sowohl in Mg-

Phosphat-Tris-Puffer (siehe 3.2) als auch in Na-K-Phosphat-Puffer (siehe 3.3) ermittelt. Dies eröffnet die Beurteilung des Einflusses des Inkubationsmilieus auf die Affinitäten der Substanzen an [³H]NMS-besetzten Rezeptoren.

Zu berücksichtigen ist allerdings, dass neben den unterschiedlichen Inkubationspuffern auch M₂-Rezeptoren verschiedener Herkunft (porcin bei den Studien in Mg-Phosphat-Tris-Puffer bzw. human bei denjenigen in Na-K-Phosphat-Puffer) verwendet wurden. Zur Abschätzung der Bedeutung dieses Unterschiedes wurden für W84 und TD2 die pEC_{0,5diss}-Werte dieser Arbeit, die unter Einsatz von Na-K-Phosphat-Puffer und humanen M₂-Rezeptoren zustande kamen, mit einigen pEC_{0,5diss}-Werten der Literatur verglichen, die mit Na-K-Phosphat-Puffer und porcinen M₂-Rezeptoren ermittelt wurden. Über die dabei erzielten Ergebnisse geben die Tabellen 4.1 und 4.2 Auskunft.

Literaturquelle	Rezeptor-Herkunft	pEC _{0,5diss} (W84) in Na-K-Phosphat-Puffer	n _H
Diese Arbeit	human	7,63 ± 0,06	-0,8 ^{ns}
Dittmann 2003	porcin	7,74 ± 0,07 ^{ns} , p=0,27	-1,3 ^{ns}
Großmüller 2003	porcin	7,67 ± 0,04 ^{ns} , p=0,61	-1,2 ^{ns}
Duda-Johner 2002	porcin	8,16 ± 0,06 ^s , p<0,01	-1,0 ^{ns}
Tränkle et al. 1996	porcin	7,62 ^{ns} , p=0,87	-1,1 ^{ns}

Tabelle 4.1: Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Bindungsdaten von W84 in Na-K-Phosphat-Puffer bei pH 7,4 und 23 °C unter Verwendung von [³H]NMS-besetzten humanen M₂-Rezeptoren und 1 nM [³H]NMS mit den an anderen Stellen veröffentlichten Analogbefunden, die unter Einsatz von 0,2 nM [³H]NMS und M₂-Rezeptoren des Hausschwein-Herzens zustande kamen. Der in der Arbeit von Tränkle et al. (1996) genannte EC_{0,5diss}-Wert wurde in einen pEC_{0,5diss}-Wert umgerechnet. pEC_{0,5diss} ist ein Maß für die Affinität des Modulators zu [³H]NMS-besetzten Rezeptoren und n_H ist das Steigungsmaß der Konzentrations-Effekt-Kurve. ^{s/ns}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied der Kurvensteilheit n_H zu -1 (F-Test) bzw. des betreffenden pEC_{0,5diss}-Wertes zu demjenigen dieser Arbeit (ungepaarter t-Test). Angegeben sind, falls möglich, die Mittelwerte ± deren Standardfehler.

Sämtliche für W84 und TD2 ermittelten Steigungskoeffizienten unterscheiden sich nicht signifikant von -1. Die Affinität von W84 zu NMS-besetzten humanen Rezeptoren, die in dieser Arbeit gefunden wurde, ist identisch zu derjenigen an porcinen Rezeptoren aus drei der vier angeführten Literaturquellen, lediglich zu dem pEC_{0,5diss}-Wert von Duda-Johner (2002) gibt es eine signifikante Differenz (siehe Tabelle 4.1). Da sich der Affinitäts-Wert von Duda-Johner (2002) jedoch signifi-

kant von allen genannten Quellen unterscheidet, wird der Differenz zu dieser Arbeit keine Bedeutung beigemessen. Zwischen den beiden angegebenen $pEC_{0,5diss}$ -Werten von TD2, die an humanen bzw. porcinen Rezeptoren bestimmt wurden, findet sich kein signifikanter Unterschied (siehe Tabelle 4.2).

Literaturquelle	Rezeptor-Herkunft	$pEC_{0,5diss}$ (TD2) in Na-K-Phosphat-Puffer	n_H
Diese Arbeit	human	$6,93 \pm 0,04$	$-1,0^{ns}$
Duda-Johner 2002	porcin	$6,85 \pm 0,11^{ns, p=0,43}$	$-1,0^{ns,D}$

Tabelle 4.2: Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Bindungsdaten von TD2 in Na-K-Phosphat-Puffer bei pH 7,4 und 23 °C unter Verwendung von [3H]NMS-besetzten humanen M_2 -Rezeptoren und 1 nM [3H]NMS (oberhalb des Trennstriches) mit dem von Duda-Johner (2002) veröffentlichten Analogbefund, der unter Einsatz von 0,2 nM [3H]NMS und M_2 -Rezeptoren des Hausschweinerzens zustande kam (unterhalb des Trennstriches). $pEC_{0,5diss}$ ist ein Maß für die Affinität des Modulators zu [3H]NMS-besetzten Rezeptoren und n_H ist das Steigungsmaß der Konzentrations-Effekt-Kurve. ^{ns}: Nicht signifikanter Unterschied der Kurvensteilheit n_H zu -1 (F-Test) bzw. des $pEC_{0,5diss}$ -Wertes von Duda-Johner (2002) zu demjenigen dieser Arbeit (ungepaarter t-Test); ^D: Ein exakter Zahlenwert wird in der Arbeit von Duda-Johner (2002) nicht genannt, es findet sich lediglich die Angabe, dass ein nicht signifikanter Unterschied vorliegt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm deren Standardfehler.

Der Rezeptor-Herkunft kommt demnach bei der Bestimmung der Affinität von W84 und TD2 zu Antagonist-besetzten M_2 -Rezeptoren unter Na-K-Phosphat-Bedingungen keine Bedeutung zu. Es erscheint daher gerechtfertigt, die in dieser Arbeit gefundenen Unterschiede zwischen den Affinitäten der Modulatoren zu humanen und porcinen Rezeptoren vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Pufferzusammensetzung zu betrachten. Tabelle 4.3 fasst die Ergebnisse zusammen. Zusätzlich sind die in den beiden Inkubationspuffern bestimmten $pEC_{0,5diss}$ -Werte von TD14, TD15, TD16 und TD32 enthalten. Zum Zweck der Gegenüberstellung sind die Affinitäten der W84-Derivate Dimethyl-W84 und WB64, die anderen Arbeiten entnommen wurden, mitaufgeführt.

Die Affinitäten von TD14 und TD32 zu [3H]NMS-besetzten Rezeptoren sind von den verwendeten Inkubationsbedingungen unabhängig, für TD2, TD15 und TD16 ergeben sich aus einem Wechsel zwar signifikante, aber nur wenig ausgeprägte Affinitäts-Verschiebungen. Demgegenüber hat das verwendete Puffersystem einen ausgeprägten Einfluss auf die Affinität der aufgeführten Alkan-Bisammonium-Ver-

bindungen. Durch den Wechsel von Mg-Phosphat-Tris- zu Na-K-Phosphat-Bedingungen nimmt der pEC_{0,5diss}-Wert in allen drei Fällen deutlich um mehr als eine Dekade zu.

Für beide Gruppen von Modulatoren ergibt sich somit ein deutlich unterschiedlicher Einfluss der Inkubationsbedingungen auf die Affinität zu besetzten Rezeptoren. Dies ist vermutlich auf die unterschiedliche Pufferzusammensetzung zurückzuführen, da Staschen (1991 und 1994) zeigen konnte, dass eine Temperaturerhöhung von 23 °C auf 37 °C die Affinität von W84 nicht wesentlich verändert.

Untersuchter Modulator	Mg-Phosphat-Tris-P. pEC _{0,5diss}	Na-K-Phosphat-P. pEC _{0,5diss}	Affinitäts-Differenz
TD2	6,73 (6,70; 6,77)	6,93 ± 0,04	0,20 ^S
TD14	6,67 ± 0,06	6,50 ± 0,04	-0,17 ^{ns}
TD15	6,59 ± 0,05	6,76 ± 0,03	0,17 ^S
TD16	6,84 ± 0,03	7,42 ± 0,04	0,58 ^S
TD32	5,79 ± 0,07	5,94 ± 0,04	0,15 ^{ns}
W84	5,99 ± 0,07	7,63 ± 0,06	1,64 ^S
Dimethyl-W84	6,77 ± 0,03 ^B	8,09 ± 0,08 ^V	1,32 ^S
WB64	7,86 ± 0,07 ^B	9,03 ± 0,05 ^B	1,17 ^S

Tabelle 4.3: Affinitäten ausgewählter Silizium-haltiger (oberhalb des Trennstriches) bzw. Alkan-Bisammonium-Modulatoren (unterhalb des Trennstriches) an [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptoren unter zwei verschiedenen Inkubationsbedingungen (3 mM MgHPO₄, 50 mM Tris, pH 7,3 und 37 °C bzw. 4 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, pH 7,4 und 23 °C). Die [³H]NMS-Konzentration betrug in allen Fällen 0,2 nM. pEC_{0,5diss} ist ein Maß für die Affinität des Modulators zu [³H]NMS-besetzten Rezeptoren und die Affinitäts-Differenz ist die Differenz aus dem pEC_{0,5diss}-Wert unter Na-K-Phosphat-Bedingungen und dem pEC_{0,5diss}-Wert unter Mg-Phosphat-Tris-Bedingungen. ^{S/ns}: Signifikanter/nicht signifikanter Unterschied zwischen den pEC_{0,5diss}-Werten (ungepaarter t-Test); ^{B/V}: Diese Daten wurden der Arbeit von Balatkova (2002) bzw. Voigtländer et al. (2003) entnommen, sie kamen unter Verwendung von 0,2 nM [³H]NMS und porcinen M₂-Rezeptoren bzw. 1 nM [³H]NMS und humanen M₂-Rezeptoren zustande. Angegeben sind die Mittelwerte ± deren Standardfehler aus zwei bis fünf unabhängigen Experimenten.

Bei der Abhängigkeit des pEC_{0,5diss}-wertes von der Zusammensetzung des Puffers kommt den Magnesium-Ionen eine zentrale Bedeutung zu. Sie verzögern wie ein allosterischer Modulator konzentrationsabhängig die [³H]NMS-Dissoziation von M₂-Rezeptoren (Burgmer et al., 1998; Schulz, 1998; Dittmann, 2003), beeinflussen kompetitiv den verzögernden Effekt von W84 auf die [³H]NMS-Dissoziation (Burgmer, 1997) und interagieren kompetitiv mit dem Radioalloster [³H]Dimethyl-

W84 (Weyand, 2001). Aufgrund dieser Befunde wird postuliert, dass Magnesium-Ionen in das Bindungsverhalten typischer Modulatoren eingreifen (Burgmer et al., 1998). Für TD2, TD14, TD15, TD16 und TD32, deren Affinitäten keine oder nur eine geringe Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Inkubationspuffers zeigen, kann somit bezüglich der Pufferabhängigkeit eine im Vergleich zu den Alkan-Bisammonium-Modulatoren andersartige Rezeptor-Interaktion vermutet werden. Auch wenn nicht auszuschließen ist, dass die zumeist fehlende Pufferabhängigkeit der Silizium-haltigen Verbindungen darauf beruht, dass sie im Gegensatz zu den Alkan-Bisammonium-Substanzen nur über eine anstatt zwei positive Ladungen verfügen, erscheint diese Schlussfolgerung vor dem Hintergrund der Literatur unwahrscheinlich. Dort findet sich eine fehlende Pufferabhängigkeit außer bei ungeladenen Modulatoren nur für solche Verbindungen, die in atypischer Form mit dem Rezeptor interagieren (Tränkle et al., 1996; Mohr, 2004). Es erscheint daher nahe liegend, dass diese Erklärung auch auf die Silizium-haltigen Substanzen zutrifft.

4.4 Epitopabhängigkeit der Bindung Silizium-haltiger Modulatoren an [³H]NMS-besetzten humanen M₂-Rezeptoren unter Na-K-Phosphat-Inkubationsbedingungen

Die sehr verschiedenen Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen den Silizium-haltigen und den Alkan-Bisammonium-Verbindungen (siehe 4.2) in Kombination mit einem deutlich unterschiedlichen Einfluss der Zusammensetzung der Inkubationspuffers auf die Affinität zu besetzten Rezeptoren (siehe 4.3) lassen vermuten, dass beide Modulator-Klassen in unterschiedlicher Art mit dem M₂-Rezeptor interagieren. Diese Hypothese wurde für TD2, TD14, TD15, TD16 und TD32 überprüft, indem die Abhängigkeit ihrer Affinität an [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptoren von den Epitopen M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin untersucht wurde, die vollständig die M₂/M₅-Selektivität von W84 erklären können (Voigtländer et al., 2003; siehe 1.4.1). Zu diesem Zweck wurden „loss-of-function-Mutationen“ verwendet, bei denen die genannten Epitope des M₂-Rezeptors durch die jeweils korrespondierende Aminosäure des M₅-Rezeptors (Glutamin bzw. Histidin) ersetzt wurden.

4.4 Epitopabhängigkeit der Bindung Silizium-haltiger Modulatoren an [³H]NMS-besetzten humanen M₂-Rezeptoren unter Na-K-Phosphat-Inkubationsbedingungen

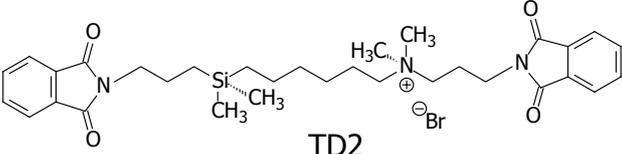
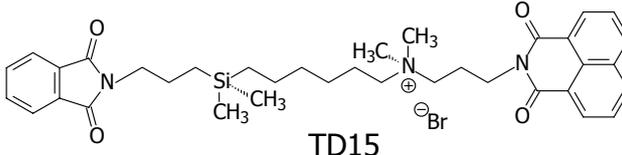
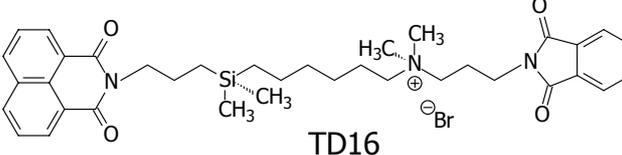
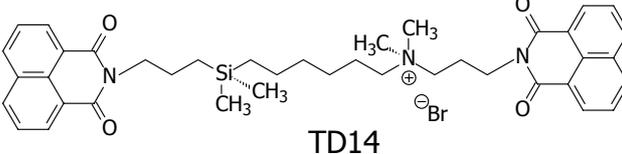
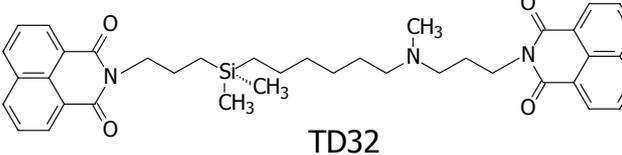
Untersuchter Silizium-haltiger Modulator	Abhängigkeit der Bindung an [³ H]NMS-besetzten M ₂ -Rezeptoren von ¹⁷⁷ Tyrosin ⁴²³ Threonin		Vollständige Erklärung der M ₂ /M ₅ -Selektivität
 <p>TD2</p>	X	-	
 <p>TD15</p>	X	-	
 <p>TD16</p>	X	-	
 <p>TD14</p>	-	-	
 <p>TD32</p>	X	X	Nein

Tabelle 4.4: Abhängigkeit der Bindung der Silizium-haltigen Modulatoren TD2, TD14, TD15, TD16 und TD32 an [³H]NMS-besetzten humanen M₂-Rezeptoren von den Aminosäuren M₂ ¹⁷⁷Tyrosin und M₂ ⁴²³Threonin. Ein Kreuz (X) bedeutet, dass die Modulator-Affinität gegenüber dem M₂-Wildtyp-Rezeptor signifikant erniedrigt ist, wenn das betreffende Epitop (Tyrosin bzw. Threonin) durch die korrespondierende Aminosäure des M₅-Wildtyp-Rezeptors (Glutamin bzw. Histidin) ersetzt wurde. Wenn beide Epitope in die Bindung involviert sind, ist zusätzlich angegeben, ob durch sie die M₂/M₅-Selektivität vollständig erklärt werden kann. Die Untersuchungen wurden durchgeführt in Na-K-Phosphat-Puffer bei pH 7,4 und 23 °C unter Verwendung von 1 nM [³H]NMS.

Wie in Tabelle 4.4 dargestellt, ist die Bedeutung der beiden Aminosäuren für den pEC_{0,5diss}-Wert innerhalb der fünf untersuchten Silizium-haltigen Verbindungen unterschiedlich. Bei TD2 sowie den jeweils einseitig Naphthalimid-substituierten Derivaten TD15 und TD16 ist die Interaktion des Modulators mit [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptoren von der ¹⁷⁷Tyrosin-Mutation abhängig, von der ⁴²³Threonin-Mutation ist sie hingegen unabhängig. Die Anlagerung des Di-Naphthalimid-haltigen Modulators TD14 kommt ohne Beteiligung der beiden untersuchten Epitope

pe zustande, demgegenüber sind sowohl M₂¹⁷⁷Tyrosin als auch M₂⁴²³Threonin in die Bindung von TD32 involviert, erklären dessen M₂/M₅-Selektivität jedoch nicht vollständig.

Aus diesem Befunden ergibt sich, dass der Austausch eines Phthalimid-Restes in TD2 durch Naphthalimid (TD15 bzw. TD16) die Epitopabhängigkeit nicht verändert, so dass das Haftareal dieser drei Modulatoren an M₂-Rezeptoren vermutlich identisch ist. Es kann durch die Naphthalimid-Einführung auf der Silizium-Seite (TD16, pEC_{0,5diss} = 7,42 ± 0,04) allerdings besser ausgenutzt werden (signifikanter Affinitäts-Gewinn gegenüber TD2, pEC_{0,5diss} = 6,93 ± 0,04), demgegenüber stört die analoge Strukturvariation auf der Ammonium-Seite (TD15, pEC_{0,5diss} = 6,76 ± 0,03) die Rezeptor-Interaktion (signifikanter Affinitäts-Verlust gegenüber TD2).

Durch die Substitution des Phthalimid-Restes von TD15 bzw. TD16 durch Naphthalimid (TD14) geht die Bedeutung von M₂¹⁷⁷Tyrosin verloren, was auf die Größenzunahme des Modulators zurückgeführt werden könnte. Es ist vorstellbar, dass TD14 dadurch zu voluminös geworden ist und in veränderter, von M₂¹⁷⁷Tyrosin unabhängiger Form mit dem Rezeptor interagiert. Für diese Hypothese spricht die Tatsache, dass TD14 gegenüber TD15 und TD16 eine signifikant erniedrigte Affinität zum M₂-Wildtyp-Rezeptor aufweist (pEC_{0,5diss} (TD14) = 6,50 ± 0,04).

Der Austausch des quartären Stickstoffes von TD14 durch einen tertiären (TD32) hat die Epitopabhängigkeit komplett verändert, beide Aminosäuren sind nun für den pEC_{0,5diss}-Wert von Bedeutung. Da zudem die M₂/M₅-Selektivität ausgehend von etwa 1,1 Dekaden (TD14) auf rund 0,6 Dekaden (TD32) nahezu halbiert wurde und die Konzentrations-Effekt-Kurven deutlich steiler geworden sind (siehe 3.3), scheint aus dieser Strukturmodifikation eine grundlegend veränderte Rezeptor-Interaktion zu resultieren.

Innerhalb dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer ein- (TD15 und TD16) oder beidseitigen (TD14) Naphthalimid-Substitution in TD2 auf die Interaktion mit [³H]NMS-besetzten Rezeptoren basierend auf zwei verschiedenen Testsystemen – porcine M₂-Rezeptoren, Mg-Phosphat-Tris-Puffer, pH 7,3 und 37 °C bzw. humane M₂-Rezeptoren, Na-K-Phosphat-Puffer, pH 7,4 und 23 °C – betrachtet. In der Gegenüberstellung fällt auf, dass unter Verwendung des ersten Testsystems diese vier Modulatoren den gleichen pEC_{0,5diss}-Wert aufweisen (siehe Abbildung 4.2) und daher vermutlich in identischer Form mit dem Rezeptor interagieren, demgegen-

über weichen die Epitopabhängigkeit (siehe Tabelle 4.4) und die Affinität von TD14 ($pEC_{0,5diss} = 6,50 \pm 0,04$) signifikant von denjenigen der Verbindungen TD2, TD15 und TD16 ($pEC_{0,5diss} = 6,93 \pm 0,04$; $6,76 \pm 0,03$ und $7,42 \pm 0,04$) ab, wenn das zweite Testsystem zum Einsatz kommt. Da die Inkubationsbedingungen keinen bedeutsamen Einfluss auf die Affinität der Testsubstanzen haben (siehe 4.3), könnte die in Relation zu den übrigen Verbindungen abweichende Rezeptor-Interaktion von TD14 darauf zurückzuführen sein, dass in diesem Fall humane und nicht porcine M₂-Rezeptoren verwendet wurden.

Nach dem Stand der gegenwärtigen Erkenntnis ist die Bindungsstelle allosterischer muskarinischer Modulatoren extrazellulär gelegen (Proska und Tucek, 1994; Burgmer et al., 1998; Voigtländer et al., 2003). Die Aminosäuresequenz des humanen M₂-Rezeptors entspricht in diesem Bereich weitgehend dem porcinen Rezeptor, nur in der Nähe des N-terminalen Endes finden sich an zwei Positionen unterschiedliche Aminosäuren:

Position der Aminosäure	Aminosäure im M ₂ -Rezeptor des	
	Menschen	Hausschwein
10	Asparagin	Serin
11	Serin	Glycin

Tabelle 4.5: Unterschiede der Aminosäuresequenz zwischen humanen und porcinen M₂-Rezeptoren innerhalb des extrazellulären Bereiches (nach Bonner et al., 1987).

Es sind zwei verschiedene Erklärungsansätze denkbar, weshalb die Art der Rezeptor-Interaktion von TD14 im Vergleich zu TD2, TD15 und TD16 vom unterschiedlichen Aufbau des N-terminalen Endes abhängen könnte. Einerseits könnten die Aminosäuren in Position 10 und 11 an der Ausgestaltung der Bindungsstelle der Silizium-haltigen Verbindungen beteiligt sein, so dass das Haftareal bei humanen M₂-Rezeptoren anders aufgebaut wäre als bei denen des Hausschweins.

Die zweite Überlegung geht auf das unterschiedliche Glykosylierungsmuster der Rezeptoren zurück, denn der humane M₂-Rezeptor ist im Gegensatz zum porcinen an Position 9 glykosyliert (Raasch, 2002; Dittmann, 2003). Dieser Glykosyl-Rest könnte die Bindungsstelle der Silizium-haltigen Verbindungen an humanen M₂-Rezeptoren verkleinern, so dass der recht voluminöse Modulator TD14 nicht mehr

wie an porcinen M_2 -Rezeptoren analog zu den kleineren Substanzen TD2, TD15 und TD16 mit dem Rezeptor in Wechselwirkung treten kann. Dies könnte erklären, weshalb sich die Art der Rezeptor-Interaktion von TD14 an humanen M_2 -Rezeptoren von derjenigen von TD2, TD15 und TD16 unterscheidet, wohingegen diese vier Verbindungen an porcinen M_2 -Rezeptoren ein einheitliches Verhalten zeigen.

4.5 Vergleich der Epitopabhängigkeit der Bindung Siliziumhaltiger Verbindungen mit derjenigen von Alkan-Bisammonium-Modulatoren

Die Bedeutung der Aminosäuren M_2 177 Tyrosin und M_2 423 Threonin für die Bindung von Modulatoren des Alkan-Bisammonium-Typs an [3 H]NMS-besetzten humanen M_2 -Rezeptoren wurde bislang anhand von vier Vertretern überprüft. Untersucht wurden neben W84 die jeweils zweifach methylierten Derivate Dimethyl-W84 bzw. $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ sowie die Substanz WB64, die zwei laterale Naphthalimid-Gruppen enthält (Voigtländer et al., 2003; Raasch, 2003 und diese Arbeit). Über die Ergebnisse dieser Studien gibt Tabelle 4.6 Auskunft.

Die beiden untersuchten Epitope erklären jeweils vollständig die M_2/M_5 -Selektivität dieser Modulatoren, zudem besitzt M_2 177 Tyrosin in allen Fällen eine gegenüber M_2 423 Threonin größere Bedeutung. Die Haftareale von (Dimethyl-)W84, $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ und WB64 sind somit ungeachtet der unterschiedlichen Modulator-Struktur vermutlich identisch.

Die untersuchten Silizium-haltigen Substanzen weisen gegenüber den Alkan-Bisammonium-Verbindungen eine deutlich abweichende Epitopabhängigkeit auf (siehe Tabelle 4.4). Diese Befunde bestätigen somit die aufgestellte Hypothese, dass es durch den singulären N^+/Si -Austausch zu einer grundlegend veränderten Interaktion mit [3 H]NMS-besetzten M_2 -Rezeptoren kommt. Aufgrund der Bedeutung, die M_2 177 Tyrosin sowohl für die Affinität der Verbindungen vom Alkan-Bisammonium-Typ als auch für diejenige von TD2, TD15, TD16 und TD32 hat, erscheint es allerdings unwahrscheinlich, dass beide Gruppen von Modulatoren

4.5 Vergleich der Epitopabhängigkeit der Bindung Silizium-haltiger Verbindungen mit derjenigen von Alkan-Bisammonium-Modulatoren

komplett unterschiedliche Haftareale am Rezeptorprotein verwenden. Es ist eher davon auszugehen, dass die Interaktionen dieser Liganden über eine gemeinsame Bindungsregion am M₂-Rezeptor zustande kommt, wobei neben M₂¹⁷⁷Tyrosin im Detail unterschiedliche Haftpunkte verwendet werden. Die Verbindung TD14, deren Epitopabhängigkeit hingegen vollständig von derjenigen der Alkan-Bisammonium-Modulatoren abweicht, könnte sich an einem anderen Bereich des Rezeptors anlagern, möglicherweise an der von Tränkle und Mohr (1997) bzw. Lazareno et al. (2000 und 2002) postulierten zweiten allosterischen Bindungsstelle.

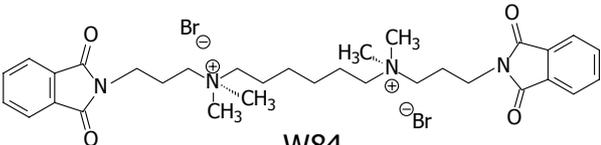
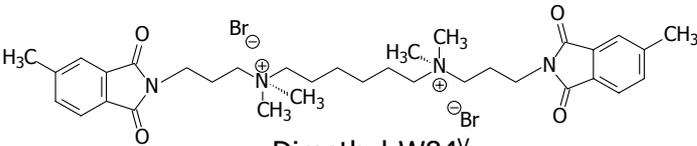
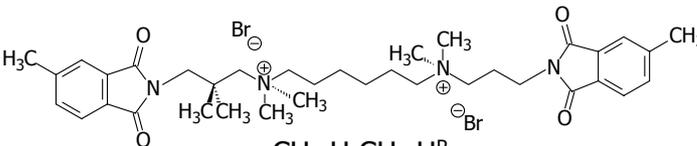
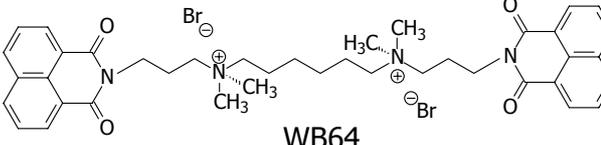
Untersucher Alkan-Bisammonium-artiger Modulator	Abhängigkeit der Bindung an [³ H]NMS-besetzten M ₂ -Rezeptoren von ¹⁷⁷ Tyrosin ⁴²³ Threonin		Vollständige Erklärung der M ₂ /M ₅ - Selektivität
 W84	X	X	Ja
 Dimethyl-W84 ^V	X	X	Ja
 CH ₃ ,H,CH ₃ ,HR	X	X	Ja
 WB64	X	X	Ja

Tabelle 4.6: Abhängigkeit der Bindung der Alkan-Bisammonium-artigen Verbindungen W84, Dimethyl-W84, CH₃,H,CH₃,H und WB64 an [³H]NMS-besetzten humanen M₂-Rezeptoren von den Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin. Ein Kreuz (X) bedeutet, dass die Modulator-Affinität gegenüber dem M₂-Wildtyp-Rezeptor signifikant erniedrigt ist, wenn das betreffende Epitop (Tyrosin bzw. Threonin) durch die korrespondierende Aminosäure des M₅-Wildtyp-Rezeptors (Glutamin bzw. Histidin) ersetzt wurde. Wenn die untersuchten Modulatoren zu den jeweils einfach punktmutierten M₂-Rezeptoren eine signifikant unterschiedliche Affinität aufweisen, ist dies durch unterschiedlich dicke Kreuze dargestellt, wobei die Punktmutante, die zu einem größeren Affinitätsverlust führt, durch ein dickeres Kreuz symbolisiert ist. Zusätzlich ist angegeben, ob die M₂/M₅-Selektivität komplett auf diesen beiden Epitopen basiert. Die Untersuchungen wurden durchgeführt in Na-K-Phosphat-Puffer bei pH 7,4 und 23 °C unter Verwendung von 1 nM [³H]NMS. ^{V/R}: Die Befunde zu Dimethyl-W84 wurden aus Voigtländer et al. (2003) entnommen, diejenigen zu CH₃,H,CH₃,H stammen von Raasch (2003).

4.6 Atypisches Verhalten der Silizium-haltigen Modulatoren

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit haben ergeben, dass das allosterische Verhalten der Silizium-haltigen Verbindungen in einer Vielzahl von Aspekten von demjenigen der Alkan-Bisammonium-Substanzen abweicht. In diesem Zusammenhang sind vor allem die folgenden Punkte zu nennen:

- veränderte Epitopabhängigkeit an [³H]NMS-besetzten Rezeptoren (siehe 4.4),
- fehlende bzw. geringe Abhängigkeit der Affinität an [³H]NMS-besetzten Rezeptoren von der Zusammensetzung des Inkubationspuffers (siehe 4.3),
- erhöhte Steilheiten einiger Konzentrations-Effekt-Kurven für die Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation (siehe 3.3),
- zumeist fehlender Einfluss lateraler Struktur-Modifikationen auf die Affinität zu [³H]NMS-besetzten und freien Rezeptoren (siehe 4.1.1 und 4.1.2).

Alle diese Punkte charakterisieren auch das Verhalten des Bispyridinium-Derivates Duo3 (Kostenis et al., 1994; Tränkle et al., 1996 und Dittmann, 2003), das als atypisch bekannt ist. Die Silizium-haltigen Verbindungen sind daher ebenfalls zu den atypischen Modulatoren zu zählen. Ihre atypischen Eigenschaften beruhen ausschließlich auf der singulären N⁺/Si-Substitution und sind von der übrigen Molekülstruktur unabhängig. Dies ergänzt die von Gilsbach et al. (2003) angestellten Überlegungen, welche Strukturelemente bei denjenigen Modulatoren, die den Alkan-Bisammonium-Substanzen strukturell ähnlich sind, über ein typisches oder atypisches Bindungsverhalten entscheiden.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist nur sehr wenig über die molekularen Vorgänge bei der Interaktion atypischer Modulatoren mit dem M₂-Rezeptor bekannt. Der Einsatz der Silizium-haltigen Verbindungen könnte im Rahmen zukünftiger Projekte jedoch wertvolle Erkenntnisse über den Mechanismus atypischer allosterischer Interaktionen ermöglichen. Dies macht diese Modulator-Klasse somit zu besonde-

ren experimentellen Werkzeugen, die für ein besseres Verständnis der allosterischen Modulation an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren sorgen könnte.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Von den muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren, die zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren zählen, sind fünf verschiedene Subtypen – M_1 bis M_5 – bekannt. Alle Rezeptor-Subtypen besitzen neben der Acetylcholin-Bindungsstelle, die auch als orthosterische Bindungsstelle bezeichnet wird, ein weiteres spezifisches Haftareal, die allosterische Bindungsstelle. Über diese kann die Bindung eines orthosterischen Liganden moduliert werden.

Zu den besonders intensiv untersuchten allosterischen Modulatoren von Muskarin-Rezeptoren zählen die Verbindungen vom Alkan-Bisammonium-Typ, die aufgrund ihrer Eigenschaften als „typische Modulatoren“ klassifiziert werden. Der Hauptvertreter dieser Gruppe ist der Modulator W84 [N,N'-Bis[3-(1,3-dihydro-1,3-dioxo-2H-isoindol-2-yl)propyl]N,N,N',N'-tetramethyl-1,6-hexan-diammoniumdibromid]. Bedingt durch die zwei quartären Stickstoffe könnte das Verteilungsmuster von W84 im Organismus jedoch ungünstig sein. Voruntersuchungen zeigten, dass der Austausch eines quartären Stickstoffes durch ein Silizium-Atom ohne Verlust der al-

losterischen Wirkqualität möglich ist. Das Silizium-Analogon von W84, TD2 [$\{6$ -[Dimethyl-(3-phthalimidopropyl)silyl]hexyl}-dimethyl-(3-phthalimidopropyl)ammoniumbromid], war der erste Vertreter der Silizium-haltigen Modulatoren. TD2 fördert wie die allermeisten anderen der bisher untersuchten Silizium-haltigen Substanzen die Bindung des Muskarin-Rezeptor-Antagonisten [^3H]-N-Methylscopolamin ([^3H]-NMS) an M_2 -Rezeptoren (positive Kooperativität), während dessen Bindung von allen strukturanalogen Alkan-Bisammonium-Modulatoren abgesenkt wird (negative Kooperativität).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollten die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Silizium-haltigen Modulatoren anhand von vierzehn Vertretern charakterisiert werden, die sich von TD2 vor allem durch die Modifikation der lateralen Phthalimid-Reste unterscheiden. Es wurden Radioligand-Bindungsstudien mit [^3H]-NMS an M_2 -Rezeptoren unter Verwendung von Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikel-Gewebe durchgeführt (Mg-Phosphat-Tris-Puffer: 3 mM $\text{MgHPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$, 50 mM Tris-HCl; pH 7,3 und 37 °C). Die allosterische Verzögerung der [^3H]-NMS-Dissoziation ergab mit dem $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$ -Wert ein Maß für die Modulator-Affinität zu [^3H]-NMS-besetzten Rezeptoren. Aus dem Effekt der Testsubstanzen auf die [^3H]-NMS-Bindung wurde die Modulator-Affinität zu freien Rezeptoren, ausgedrückt durch die Kenngröße pK_A , sowie die Kooperativität mit [^3H]-NMS, ausgedrückt durch den Parameter $\text{p}\alpha$, abgeleitet.

Die Affinität zu [^3H]-NMS-besetzten Rezeptoren ist von den strukturellen Variationen an TD2 weitgehend unabhängig, solange der quartäre Stickstoff und zumindest ein lateraler aromatischer Rest erhalten bleibt. Die Affinität zu freien Rezeptoren wird hingegen stärker verändert, der pK_A -Wert scheint im Vergleich zu TD2 mit zunehmendem Größe der lateralen Reste geringer zu werden. Mit Ausnahme einer neutral kooperativen Substanz erhöhen alle getesteten Silizium-haltigen Modulatoren mit einem aromatischen Rest auf der Silizium-Seite des Moleküls die [^3H]-NMS-Bindung, die positive Kooperativität ist dabei im Vergleich zu TD2 zu meist signifikant stärker ausgeprägt.

Der Vergleich dieser Struktur-Wirkungs-Beziehungen mit denen der strukturanalogen Alkan-Bisammonium-Modulatoren ergab deutliche Unterschiede. Der N^+/Si -Austausch hat die allosterische Interaktion mit dem Rezeptorprotein offenbar grundlegend geändert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Rezeptor-Interaktion ausgewählter Siliziumhaltiger Substanzen unter Verwendung von Rezeptormutanten näher untersucht. Es war bekannt, dass die M_2/M_5 -Selektivität von W84 an $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten Rezeptoren vollständig durch die beiden Aminosäuren M_2 $^{177}\text{Tyrosin}$ und M_2 $^{423}\text{Threonin}$ erklärbar ist. Die humanen M_2 - und M_5 -Wildtyp- sowie punktmutierten M_2 -Rezeptoren wurden in COS7-Zellen exprimiert. An Membransuspensionen dieser Zellen wurden die Affinitäten der Testsubstanzen zu den jeweiligen mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ besetzten Rezeptoren bestimmt (Na-K-Phosphat-Puffer: 4 mM Na_2HPO_4 , 1 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4 und 23 °C). Es zeigte sich, dass das Epitop M_2 $^{423}\text{Threonin}$ nicht in die Bindung von TD2 involviert ist, dies gilt auch für die durch ein- oder beidseitige, laterale Naphthalimid-Einführung entstandenen TD2-Derivate. Demgegenüber ist die Bedeutung von M_2 $^{177}\text{Tyrosin}$ offenbar von der Struktur des Modulators abhängig, für TD2 sowie für dessen Mono-Naphthalimid-Derivate erwies sich M_2 $^{177}\text{Tyrosin}$ als relevant, für diejenige Silizium-haltige Substanz, die zwei endständige Naphthalimid-Reste trägt, hingegen nicht. Im Gegensatz dazu erklären die beiden Epitope komplett die M_2/M_5 -Selektivität des analogen W84-Derivates mit zwei endständigen Naphthalimid-Resten. Die unterschiedlichen Struktur-Wirkungs-Beziehungen beider Modulator-Klassen unterliegen somit einer verschiedenartigen Abhängigkeit von den Aminosäuren des Rezeptorproteins.

Neben dem zumeist fehlenden Einfluss lateraler Strukturmodifikationen auf die Affinität und der gegenüber den W84-artigen Verbindungen veränderten Epitopabhängigkeit ist das Verhalten der Silizium-haltigen Substanzen zudem durch eine fehlende Abhängigkeit des $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$ -Wertes von der Zusammensetzung des Inkubationspuffers sowie teilweise signifikant erhöhten Steilheiten der Konzentrations-Effekt-Kurven gekennzeichnet. Diese Eigenschaften erlauben es, die Silizium-haltigen Verbindungen den atypischen allosterischen Modulatoren zuzuordnen. Im Rahmen zukünftiger Projekte könnten sie daher als wertvolle Forschungswerkzeuge dienen, um einen tieferen Einblick in die molekularen Mechanismen atypischer allosterischer Wechselwirkungen mit Muskarin-Rezeptoren zu erhalten, worüber zur Zeit nur wenig bekannt ist.

Kapitel 6

Literaturverzeichnis

Allan, A. M. und Harris, R. A. (1986): Gamma-Aminobutyric acid agonists alter chloride flux across brain membranes. *Mol Pharmacol*, **29**: 497 – 505.

Balatkova, E. (2002): Untersuchungen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Alkan-bis-ammonium-Verbindungen als allosterische Modulatoren an Acetylcholin-Rezeptoren des Subtyps M₂. *Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn*.

Barlow, R. und Blake, J. (1989): Hill coefficients and the logistic equation. *Trends Pharmacol Sci*, **10**: 440 – 441.

Barnes, P. J. (2000): The pharmacological properties of tiotropium. *CHEST*, **117**: 63s – 67s.

- Bender, W., Staudt, M., Tränkle, C., Mohr, K. und Holzgrabe, U. (2000): Probing the size of a hydrophobic binding pocket within the allosteric site of muscarinic acetylcholine M₂ receptors. *Life Sci*, **66**: 1675 – 1682.
- Bennett, J. P. und Yamamura, H. I. (1985): Neurotransmitter, hormone, or drug receptor binding methods. *Neurotransmitter receptor binding (2nd ed.)*, edited by Yamamura H. I. et al., Raven Press, New York, 61 – 89.
- Birdsall, N. J., Farries, T., Gharagozloo, P., Kobayashi, S., Kuonen, D., Lazareno, S., Popham, A. und Sugimoto, M. (1997): Selective allosteric enhancement of the binding and actions of acetylcholine at muscarinic receptor subtypes. *Life Sci*, **60**: 1047 – 1052.
- Birdsall, N. J., Nathanson, N. und Schwarz, R. (2001): Muscarinic receptors: it's a knockout. *Trends Pharmacol Sci*, **22**: 215 – 219.
- Block, G. A., Martin, K. J., de Francisco, A. L., Turner, S. A., Avram, M. M., Suranyi, M. G., Hercz, G., Cunningham, J., Abu-Alfa, A. K., Messa, P., Coyne, D. W., Locatelli, F., Cohen, R. M., Evenepoel, P., Moe, S. M., Fournier, A., Braun, J., McCary, L. C., Zani, V. J., Olson, K. A., Drueke, T. B. und Goodman, W. G. (2004): Cinacalcet for secondary hyperparathyroidism in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med*, **350** : 1516 – 1525.
- Bonner, T., Buckley, N., Young, A., und Brann, M. (1987): Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science*, **237**: 527 – 532.
- Bonner, T., Young, A., Brann, M. und Buckley, N. (1988): Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron*, **1**: 403 – 410.
- Bonner, T. (1989): The molecular basis of receptor diversity. *Trends Neurosci*, **12**: 148 – 151.

- Botero Cid, H. M., Tränkle, C., Baumann, K., Pick, R., Mies-Klomfass, E., Kostenis, E., Mohr, K. und Holzgrabe, U. (2000): Structure-activity relationships in a series of bisquaternary bisphthalimide derivatives modulating the muscarinic M₂-receptor allosterically. *J Med Chem*, **43**: 2155 – 2164.
- Buller, S., Zlotos, D., Mohr, K. und Ellis, J. (2002): Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: A single amino acid in transmembrane region 7 is critical to the subtype selectivities of caracurine V derivatives and alkane-bisammonium ligands. *Mol Pharmacol*, **61**: 160 – 168.
- Burgmer, U. (1997): Effekte kationischer Pufferkomponenten auf die Wirkung allosterischer Modulatoren an kardialen Muscarinrezeptoren. *Dissertationschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn*.
- Burgmer, U., Schulz, U., Tränkle, C. und Mohr, K. (1998): Interaction of Mg²⁺ with the allosteric site of muscarinic M₂ receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **357**: 363 – 370.
- Caulfield, M. (1993): Muscarinic receptors: Characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther*, **58**: 319 – 379.
- Caulfield, M. und Birdsall, N. J. (1998): International union of pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev*, **50**: 279 – 290.
- Cheng, Y. und Prusoff, W. (1973): Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol*, **22**: 3099 – 3108.
- Christopoulos, A. (1998): Assessing the distribution of parameters in models of ligand-receptor interaction: to log or not to log. *Trends Pharmacol Sci*, **19**: 351 – 537.
-

- Christopoulos, A., Sorman, J. L., Mitchelson, F. und El-Fakahany, E. E. (1999): Characterization of the subtype selectivity of the allosteric modulator heptane-1,7-bis-(dimethyl-3'-phthalimidopropyl) ammonium bromide (C7/3-phth) at cloned muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol*, **58**: 323 – 331.
- Christopoulos, A. und Kenakin, T. (2002): G protein-receptor allosterism and cemp lexing. *Pharmacol Rev*, **54**: 323 – 374.
- Daiss, J. O., Duda-Johner, S., Burschka, C., Holzgrabe, U., Mohr, K. und Tacke, R. (2002): N⁺/Si replacement as a tool for probing the pharmacophore of allosteric modulators of muscarinic M₂ receptors: synthesis, allosteric potency, and positive cooperativity of silicon-based W84 derivativs. *Organometallics*, **21**: 803 – 811.
- Daiss, J. O. (2004): Persönliche Mitteilung.
- DeBlasi, A., O'Reilly, K. und Motulsky, H. (1989): Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. *Trends Pharmacol Sci*, **10**: 227 – 229.
- Dittmann, A. (2003): Untersuchungen zur Topologie der Interaktion atypischer allosterischer Modulatoren mit dem M₂-Acetylcholin-Rezeptor. *Dissertati onsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn*.
- Dörje, F., Wess, J., Lambrecht, G., Tacke, R., Mutschler, E. und Brann, M. R. (1991): Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic re ceptor subtypes. *J Pharmacol Exp Thr*, **256**: 727 – 733.
- Duda-Johner, S. (2002): Neuartige Silicium-haltige allosterische Modulatoren als hochpotente atypische Förderer der Gleichgewichtsbindung eines or thosterischen Liganden an muskarinischen M₂-Acetylcholin-Rezeptoren. *Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn*.
-

- Duttaroy, A., Gomeza, J., Gan, J., Siddiqui, N., Basile, A., Harman, W., Smith, P., Felder, C., Levey, A. und Wess, J. (2002): Evaluation of of muscarinic agonist-induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Mol Pharmacol*, **62**: 1084 – 1093.
- Eglen, R. M., Choppin, A. und Watson, N. (2001): Therapeutic oppurtunities from muscarinic receptor research. *Trends Pharmacol Sci*, **22**: 409 – 414.
- Ehlert, F. J. (1988): Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol Pharmacol*, **33**: 187 – 194.
- Ellis, J., Huyler, J. und Brann, M. (1991): Allosteric regulation of cloned m1-m5 muscarinic receptor subtypes. *Biochem Pharmacol*, **42**: 1927 – 1932.
- Ellis, J. und Seidenberg, M. (1992): Two allosteric modulators interact at a common site on cardiac muscarinic receptors. *Mol Pharmacol*, **44**: 583 – 588.
- Ellis, J., Seidenberg, M. und Brann, M. (1993): Use of chimeric muscarinic receptors to investigate epitopes involved in allosteric interactions. *Mol Pharmacol*, **44**: 583 – 588.
- Ellis, J. und Seidenberg, M. (2000): Interaction of alcuronium, TMB-8, and other allosteric ligands with muscarinic acetylcholine receptors: Studies with chimeric receptors. *Mol Pharmacol*, **58**: 1451 – 1460.
- Felder, C. C. (1995): Muscarinic acetylcholine receptors: Signal transduction through multiple effectors. *FASEB J*, **9**: 619 – 625.
- Felder, C. C., Bymaster, F. P., Ward, J. und DeLapp, N. (2000): Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. *J Med Chem*, **43**: 4333 – 4353.
-

- Ferrari-Di Leo, G., Waelbroeck, M., Mash, D. C. und Flynn, D. D. (1994): Selective labelling and localization of the M₄ muscarinic receptor. *Mol Pharmacol*, **46**: 1028 – 1035.
- de Francisco, A. L. (2005): Cinacalcet HCl: a novel therapeutic for hyperparathyroidism. *Expert Opin Pharmacother*, **6**: 441 – 452.
- Friedhoff, A. J. und Alpert, M. A. (1973): Dopaminergic-cholinergic mechanism in the production of psychotic symptoms. *Biol Psychiatry*, **6**: 165 – 169.
- Gilsbach, R., Großmüller, M., Alptüzün, V., Erciyas, E., Tränkle, C., Holzgrabe, U. und Mohr, K. (2003): Cooperative interactions at M₂ muscarinic acetylcholine receptors: Structure/cativity relationships in stepwise shortened Bispyridinium- and Bis(ammonio)alkane-type allosteric modulators. *Neurochem Res*, **28**: 667 – 673.
- Gnagey, A., Seidenberg, M. und Ellis, J. (1999): Site-directed mutagenesis reveals two epitopes involved in the subtype selectivity of allosteric interactions of gallamine at muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*, **56**: 1245 – 1253.
- Gomez, J., Shannon, H., Kostenis, E., Felder, C., Zhang, L., Brodtkin, J., Grinberg, A., Sheng, H. und Wess, J. (1999): Pronounced pharmacologic deficits in m2 muscarinic acetylcholine knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**: 1692 – 1697.
- Großmüller, M. (2003): Interaktion allosterischer Modulatoren mit dem Agonisten [³H]Oxotremorin-M und dem Antagonisten [³H]N-Methylscopolamin an muskarinischen M₂-Rezeptoren. *Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn*.
- Hill, A. (1910): The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol Proc*, **40**: iv – vii.
-

- Holzgrabe, U, Wagener, M. und Gasteiger, J. (1996a): Comparison of structurally different allosteric modulators of muscarinic receptors by self-organizing neutral networks. *J Mol Graph*, **14**: 185 – 193.
- Holzgrabe, U. und Hopfinger, A. J. (1996b): Conformational analysis, molecular shape comparison, and pharmacophore identification of different allosteric modulators of muscarinic receptors. *J Chem Inf Comp Sci*, **36**: 1018 – 1024.
- Holzgrabe, U. und Mohr, K. (1998): Allosteric modulators of ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors. *Drug Discovery Today*, **3**: 214 – 222.
- Holzgrabe, U., Bender, W., Botero Cid, H. M., Staudt, M., Pick, R., Pfletschinger, C., Balatkova, E., Tränkle, C. und Mohr, K. (2000): Ligands for the common allosteric site of M₂ receptors: development and application. *Pharm Acta Helv*, **74**: 149 – 155.
- Hulme, E. C., Birdsall, N. J. und Buckley, N. J. (1990): Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **30**: 633 – 673.
- Ikeda, K., Kobayashi, S., Suzuki, M., Miyata, K., Takeuchi, M., Yamada, T. und Honda, K. (2002): M(3) receptor antagonism by the novel antimuscarinic agent solifenacin in the urinary bladder and salivary gland. *Nauyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **366**: 97 – 103.
- Jakubik, J., Bacakova, L., El-Fakahany, E. E. und Tucek, S. (1995): Subtype selectivity of the positive allosteric action of alcuronium at cloned M₁-M₅ muscarinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, **274**: 1077 – 1083.
- Jepsen, K., Lüllmann, H., Mohr, K. und Pfeffer J. (1988): Allosteric stabilization of 3H-N-methylscopolamine binding in guinea-pig myocardium by an anti-

dote against organophosphate intoxication. *Pharmacol Toxicol*, **63**: 163 – 168.

Jöhren, K. und Höltje, H. (2000): A model of the human M₂ muscarinic acetylcholine receptor. *J Comput Aided Mol Des*, **16**: 795 – 801.

Kostenis, E., Holzgrabe, U. und Mohr, K. (1994): Allosteric effect on muscarinic M₂ receptors of derivatives of the alkane-bis-ammonium compound W84. Comparison with bispyridinium-type allosteric modulators. *Eur J Med Chem*, **29**: 947 – 953.

Kostenis, E. und Mohr, K. (1996a): Two-point kinetic experiments to quantify allosteric effects on radioligand dissociation. *Trends Pharmacol Sci*, **17**: 280 – 283.

Kostenis, E. und Mohr, K. (1996b): Kostenis and Mohr reply: Composite action of allosteric modulators on ligand binding. *Trends Pharmacol Sci*, **17**: 443 – 444.

Krejci, A. und Tucek, S. (2002): Quantification of mRNA for M(1) to M(5) subtypes of muscarinic receptors in rat heart and brain cortex. *Mol Pharmacol*, **61**: 1267 – 1272.

Kubo, T., Maeda, A., Sugimoto, K., Akiba, I., Mikami, A., Takahashi, H., Haga, T., Haga, K., Ichiyama, A. und Kangawa, K. (1986): Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett*, **209**: 367 – 372.

Lazareno, S. und Birdsall, N. J. (1995): Detection, quantification, and verification of allosteric interactions of agents with labeled and unlabeled ligands at G protein-coupled receptors: interactions of strychnine and acetylcholine at muscarinic receptors. *Mol Pharmacol*, **48**: 362 – 378.

- Lazareno, S., Popham, A. und Birdsall, N. J. (2000): Allosteric interactions of Staurosporine and other Indolocarbazoles with N-[Methyl-(3)-H]Scopolamine and acetylcholine at muscarinic receptor subtypes: Identification of a second allosteric site. *Mol Pharmacol*, **58**: 194 – 207.
- Lazareno S., Popham, A. und Birdsall, N. J. (2002): Analogs of WIN 62,577 define a second allosteric site on muscarinic receptors. *Mol Pharmacol*, **62**: 1492 – 1505.
- Lee, N. und El-Fakahany, E. (1988): Influence of ligand choice on the apparent binding profile of gallamine to cardiac muscarinic receptors. Identification of three main types of gallamine-muscarinic receptor interaction. *J Pharmacol Exp Ther*, **246**: 829 – 838.
- Leppik, R. A., Miller, R. C., Eck, M. und Paquet, J. L. (1994): Role of acidic amino acids in the allosteric modulation by gallamine of antagonist binding at the m2 muscarinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol*, **45**: 983 – 990.
- Levey, A. I., Kitt, C. A., Simonds, W. F., Price, D. L. und Brann, M. R. (1991): Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J Neurosci*, **11**: 3218 – 3226.
- Li, R., Tränkle, C., Mohr, K. und Holzgrabe, U. (2001): Hexamethonium-type allosteric modulators of the muscarinic receptors bearing lateral dibenzazepine moieties. *Arch Pharm Pharm Med Chem*, **334**: 121 – 124.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. und Randall, R. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**: 265 – 275.

- Lüllmann, H., Ohnesorge, F., Schauwecker, G. und Wassermann, O. (1969): Inhibition of the action of carbachol and DFP on guinea pig isolated atria by alkane-bis-ammonium compounds. *Eur J Pharmacol*, **6**: 241 – 247.
- Maelicke, A., Schrattenholz, A., Samochocki, M., Radina, M. und Albuquerque, E.-X. (2000): Allosterically potentiating ligands of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*, **113**: 199 – 206.
- Mohr, K. und Tränkle, C. (2003): Structure/activity relationships of M₂ muscarinic allosteric modulators. *Receptors and Channels*, **9**: 229 – 240.
- Mohr, M. (2004): Interaktion eines M₂-selektiven Antagonisten und strukturverwandter orthosterisch/allosterischer Hybridsubstanzen mit dem muskarinischen M₂-Acetylcholin-Rezeptor. *Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn*.
- Motulsky, H. (1995): *Intuitive Biostatistics*, 1st ed. Oxford University Press, Inc., New York.
- Muth, M., Bender, W., Scharfenstein, O., Holzgrabe, U., Balatkova, E., Tränkle, C. und Mohr, K. (2003): Systematic development of high affinity Bis(ammonio)alkane-type allosteric enhancers of muscarinic ligand binding. *J Med Chem*, **46**: 1031 – 1040.
- Muth, M., Sennwitz, M., Mohr, K. und Holzgrabe, U. (2005): Muscarinic allosteric enhancers of ligand binding: Pivotal pharmacophoric elements in hexamethonio-type agents. *J Med Chem*, **48**: 2212 – 2217.
- Nassif-Makki, T., Tränkle, C., Zlotos, D., Bejeuhr, G., Cambareri, A., Pfletschinger, C., Kostenis, E., Mohr, K. und Holzgrabe, U. (1999): Bisquaternary ligands of the common allosteric site of M₂ acetylcholine receptors:

Search for the minimum essential distances between the pharmacophoric elements. *J Med Chem*, **42**: 849 – 858.

- Nelson, C. P., Gupta, P., Napier, C. M., Nahorski, S. R. und Challiss, R. A. (2004): Functional selectivity of muscarinic receptor antagonists for inhibition of M3-mediated phosphoinositide responses in guinea pig urinary bladder and submandibular salivary gland. *J Pharmacol Exp Ther*, **310**: 1255 – 1265.
- Okayama, H. und Berg, P. (1983): A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **3**: 280 – 289.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. und Miyano, M. (2000): Crystal structure of rhodopsin: a G Protein-coupled receptor. *Science*, **289**: 739 – 745.
- Peacock, M., Bilezikian, J. P., Klassen, P. S., Guo, M. D., Turner, S. A. und Shoback, D. (2005): Cinacalcet hydrochloride maintains long-term normocalcemia in patients with primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, **90**: 135 – 141.
- Pogozheva, I. D., Lomize, A. L. und Mosberg, H. I. (1997): The transmembrane 7- α -bundle of rhodopsin: Distance geometry calculations with hydrogen bonding constraints. *Biophys J*, **72**: 1963 – 1985.
- Proska, J. und Tucek, S. (1994): Mechanisms of steric and cooperative actions of alcuronium on cardiac acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*, **45**: 709 – 717.
- Raasch, A. (2003): Allosterische Modulation an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren des Subtyps M₂: Identifizierung essentieller Strukturelemente für

Förderer der *N*-Methylscopolamin-Bindung vom Alkan-Bisammonium-Typ. *Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn*.

Raasch, A., Scharfenstein, O., Tränkle, C., Holzgrabe, U. und Mohr, K. (2002): Elevation of ligand binding to muscarinic M₂ acetylcholine receptors by Bis(ammonio)alkane-type allosteric modulators. *J. Med. Chem*, **45**: 3809-3812.

Reever, C. M., Ferrari-Di Leo, G. und Flynn, D. D. (1997): The M₅ receptor subtype: Fact or fiction? *Life Sci*, **60**: 1105 – 1112.

Richards, M. H. (1991): Pharmacology and second messenger interactions of cloned muscarinic receptors. *Biochem Pharmacol*, **42**: 1645 – 1653.

Santos, M. D., Alkondon, M., Pereira, E. F. R., Aracava, Y., Eisenberg, H. M., Maelicke, A. und Albuquerque, E.-X. (2002): The nicotinic allosteric potentiating ligand galantamin facilitates synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Mol Pharmacol*, **61**: 1222 – 1234.

Schulz, U. (1998): Antagonismus-Untersuchungen zur Topologie der Bindung allosterischer Modulatoren an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren des Subtyps M₂. *Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn*.

Shi, H., Wang, H. und Wang, Z. (1999): Identification and characterization of multiple subtypes of muscarinic acetylcholine receptors and their physiological functions in canine hearts. *Mol Pharmacol*, **55**: 497.

Sieghardt, W. (1992): GABA_A receptors: ligand-gated Cl⁻ ion channels modulated by multiple drug-binding sites. *Trends Pharmacol Sci*, **13**: 446 – 450.

Soudijn, W., van Wijngaarden, I. und Ijzerman, A. P. (2001): Allosteric modulation of G-protein-coupled receptors. *Expert Opin Ther Patents*, **11**: 1889 – 1904.

- Spalding, T. A., Birdsall, N. J., Curtis, C. A. und Hulme, E. C. (1994): Acetylcholine mustard labels the binding site aspartate in muscarinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem*, **269**: 4092 – 4097.
- Staschen, C. M. (1991): The allosteric effect of W84 on muscarinic receptors is weakly temperature dependent. *Naun Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **343**: Suppl., R91.
- Staschen, C. M. (1994): Einfluss der Temperatur auf die Bindungseigenschaften der muscarinischen Cholinozeptoren in Herzen und in Hirnen des Meerschweinchens für das Hexamethonium-Derivat W84. *Verlag Shaker*.
- Staudt, M., Tränkle, C., Mohr, K. und Holzgrabe, U. (1998): Contribution of lateral substituents in Heptane-Bisammonium derivatives to the allosteric stabilization of antagonist binding to M₂ receptors. *Life Sci*, **62**: 423 – 429.
- Stockton, J., Birdsall, N., Burgen, A. und Hulme, E. (1983): Modification of the binding properties of muscarinic receptors by gallamine. *Mol Pharmacol*, **23**: 551 – 557.
- Tränkle, C., Kostenis, E., Burgmer, U. und Mohr, K. (1996): Search for lead structures to develop new allosteric modulators of muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, **279**: 926 – 933.
- Tränkle, C. und Mohr, K. (1997): Divergent modes of action among cationic allosteric modulators of muscarinic M₂ receptors. *Mol Pharmacol*, **51**: 674 – 682.
- Tränkle, C., Andresen, I., Lambrecht, G. und Mohr, K. (1998): M₂ receptor binding of the selective antagonist AF-DX 384: possible involvement of the common allosteric site. *Mol Pharmacol*, **53**: 304 – 312.

- Tucek, S. und Proska, J. (1995): Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **16**: 205 – 212.
- Voigtländer, U., Jöhren, K., Mohr, M., Raasch, A., Tränkle, C., Buller, S., Ellis, J., Höltje, H.-D. und Mohr, K. (2003): Allsoteric site on muscarinic acetylcholine receptors: Identification of two amino acids in the muscarinic M₂ receptor that account entirely for the M₂/M₅ subtype selectivities of some structurally diverse allosteric ligands in *N*-methylscopolamine-occupied receptors. *Mol Pharmacol*, **64**: 21 – 31.
- Wess, J. (1993): Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. *Trends Pharmacol Sci*, **14**: 308 – 313.
- Weyand, O. (2001): Allosterische Modulation an muskarinischen M₂-Acetylcholinrezeptoren: Nutzung des Radioliganden [³H]Dimethyl-W84 zur Überprüfung grundlegender Modellvorstellungen und Eröffnung neuer Einsichten. *Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn*.

Kapitel 7

Anhang

Nachfolgend sind die statistischen Gegenüberstellungen der $pEC_{0,5diss}$ -Werte (Tabelle 7.1), der pK_A -Werte (Tabelle 7.2) sowie der $p\alpha$ -Werte (Tabelle 7.3) sämtlicher im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Silizium-haltigen allosterischen Modulatoren zusammengefasst. Angegeben sind jeweils die p -Werte, die aus einem ungepaarten t -Test resultieren. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) sind durch eine hellgraue Einfärbung hervorgehoben. Für den Fall statistisch ungleicher Standardfehler wurde eine Korrektur nach Welch („(W)“) hinzugenommen.

Kapitel 8

Veröffentlichungen

8.1 Wissenschaftliche Originalarbeiten

Daiss, J. O., Albrecht, M., Mohr, K. und Tacke, R. (2004): Novel silicon-based uncharged allosteric modulator for ligand binding to muscarinic M₂ receptors: Synthesis and pharmacological characterization. *Organometallics*, **23**: 6052 – 6057.

8.2 Abstrakta und Kongressbeiträge

Albrecht, M., Daiss, J. O., Tacke, R. und Mohr, K. (2003): Lateral ring methylation increases the effect of silicon-containing allosteric enhancers of muscarinic ligand binding. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **367 (Suppl 1)**: R89.

Albrecht, M., Daiss, J. O., Tacke, R. und Mohr, K. (2003): Consequences of lateral ring modification in silicon-containing muscarinic allosteric agents. *DPhG-Jahrestagung Würzburg*.

Albrecht, M., Daiss, J. O., Tacke, R. und Mohr, K. (2004): Silicon-containing muscarinic allosteric enhancers: Essential influence of lateral aromatic moieties. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **369 (Suppl 1)**: R92.

Albrecht, M., Daiss, J. O., Tacke, R. und Mohr, K. (2004): Silicon-containing muscarinic allosteric enhancers: Atypical dependence on receptor epitopes. *Programm und Abstraktbuch der DPhG-Jahrestagung Regensburg (ISBN 3-00-014723-3)*: SL 7.